Agriculture and Agri-Food Canada
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Research Branch
Direction générale de la recherche

Canada

A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*

Technical Bulletin No. 29

Horticultural Research and Development Centre

Web site: http://res2.agr.ca/stjean/crdh.htm

101-04926/

A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*

Technical Bulletin No. 29

Kwang-Bo Joung, M. Sc.
Horticultural R & D Centre
Doctorate Program in Environmental Sciences
Université du Québec in Montréal, Qc
Canada

Jean-Charles Côté, Ph. D.
Scientist in microbiology
Horticultural R & D Centre
Research Branch
Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc
Canada

Copies available at :
Horticultural R&D Centre web site at
http://res2.agr.ca/stjean/crdh.htm
under Publications

Cat. No. A54-9/29
ISSN 0825-4559
ISBN 0-662-65398-X

© PWGSC 2000

TABLE OF CONTENTS

SUMMARY 2

INTRODUCTION 2
1. Advantages of microbial insect pest control 2
2. Early history of microbial insect pest control 2
3. What is *Bacillus thuringiensis* (Bt) 3
   3.1. Bt δ-endotoxins and mode of action 3
   3.2. Commercial use of Bt products 3

CHAPTER I. ECOLOGICAL IMPACTS 4
1. Environmental fate of Bt 4
   1.1. On foliage 4
   1.2. In soil 4
   1.3. In water 4
2. Effects of Bt on soil 4
3. Effects of Bt on water 4
4. Effects of Bt on plants 4
5. Effects on non-target invertebrates 5
   5.1. Soil microorganisms 5
   5.2. Non-target Lepidoptera 5
   5.3. Honey bees 5
   5.4. Other Invertebrates 5
   5.5. Aquatic invertebrates 6
6. Effects on vertebrates 6
   6.1. Fishes 6
   6.2. Amphibians and reptiles 6
   6.3. Birds 7
   6.4. Mammals 7
7. Effects on human beings 7
8. Evolution of resistance 8

CHAPTER II. ECONOMICAL IMPACTS 9

CHAPTER III. SOCIOCULTURAL IMPACTS 10
1. Consumers response 10
2. Public response to spraying 10

CONCLUSIONS AND PROSPECTS 11
Table 1. Commercial products based on *Bacillus thuringiensis* 11
Table 2. Toxicity data of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 12

REFERENCES 13

SUMMARY

The use of chemical insecticides for the control of insect pests has proven very effective at increasing today's agriculture and forestry productivities. However, increased public concern regarding the potential adverse environmental effects of chemical insecticides has prompted the examination of an alternative methods for insect pest control. *Bacillus thuringiensis* (Bt) accounts for 95% of the world market of microbial pest control agents.

This document focuses on the environmental impacts of the use of conventional Bt-based commercial products as a microbial insect pests control agent. This includes ecological, economical, and social impacts. Ecological impacts, that is biotic and abiotic effects, of Bt are reviewed in chapter I. Direct and indirect possible economical benefits of the use of Bt are discussed in chapter II. Socio-cultural impacts, the consumers reactions regarding the use of pesticides in agriculture and public response to Bt spraying program, are discussed in chapter III.

INTRODUCTION

The introduction of DDT in 1945 and the following move towards the use of synthetic chemical insecticides has played a key role in the increase of agricultural productivity, protection of crops and forests and in the control of insect vectors of human diseases. However the heavy use of chemical insecticides has not been without drawbacks. Let's mention contamination of water and food sources, poisoning of non-target fauna and flora, concentration in the food chain and selection of insect pest populations resistant to the chemical insecticides. Increased public concern of the potential adverse environmental effects associated with the heavy use of chemical insecticides has prompted the examination of alternative methods for insect pest control. One of the promising alternatives is the use of entomopathogenic microorganisms such as *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt).

A limitation to the rate of progress in the introduction of many potential entomopathogenic microorganisms in the field is the relative lack of knowledge about their ecology and about the fate and effects of the applied micro-organisms in the field. The mode of application, the persistence of the introduced micro-organisms, their reproductive rate (multiplication), the rate of gene transfer to indigenous organisms, their movement away from the site of application (dissemination) and the effects on the balance and functioning of the exposed ecosystem (safety, benefit and harm) are of major importance and must be assessed before a release can be considered (Trevors et al., 1987).

There is a well-documented history of the safe application of Bt in the environment: a small number of wild-type strains, formulated as commercial products, have been applied in increasingly large quantities as insecticides for over three decades to food crops, ornamentals, forest trees and stored grains without incident or harm (Meadows, 1993). In addition, many fundamental and applied researches that have accompanied the exploitation and study of Bt have provided some limited knowledge of its behavior in the environment.

1. Advantages of microbial insect pest control

An important benefit of microbial control agents is that they can be used to replace, at least in part, some more hazardous chemical pest control agents. At the present time, chemical controls are far more commonly used in the world than microbial controls. It is unclear whether or not all chemical pesticides are environmentally harmful, so replacing all of them with microbial agents would not necessarily guarantee fewer environmental risks. Nonetheless, for the numerous chemical pesticides known to have toxic effects beyond their target pests—including toxic effects to animals and human—the opportunity to substitute safer, more selective, and biodegradable biocontrol agents can provide important ecological benefits. One of the ecological advantages of microbial control agents is that they tend to be highly selective, infecting or killing a very narrow range of target pests.

2. Early history of microbial insect pest control

The study of diseases of insects, mites and other invertebrates, the science of invertebrate pathology, provides the scientific foundations of microbial control. Invertebrate pathology has its origin in the study of diseases in beneficial organisms such as silkworm and honey bee. The first observations of diseased silkworms were made in China as early as 2700 BC and by Aristotle on honey bees in 335 BC. It was not until the work of Bassi in 1834 that a microorganism, the fungus *Beauveria bassiana*, was associated with the production of disease in an animal, the silkworm. Thirty years later, Louis Pasteur followed up with a more thorough study of the various diseases of the silkworm. Both of these 19th century pioneers suggested that microorganisms could be used to control insect pests (Steinhaus, 1956).

Although several developments in invertebrate pathology took place in the late 19th and the first half of this century, it wasn't until the discovery, development and subsequent commercial production of *Bacillus thuringiensis* Berliner that practical use of microbial control began on a large scale (Lacey and Goettel, 1995). So far, even though more than 100 bacterial species have been identified as insect pathogens, only certain *Bacillus* species have met with some commercial success, especially Bt (Starnes et al., 1993).

3. What is *Bacillus thuringiensis*

Bt is a gram-positive, rod-shape, aerobic, and spore-forming bacterium closely related to the omnipresent soil bacteria *Bacillus cereus*. The vegetative cells are 1 µm in width, 5 µm long, and have short hair-like flagellae. Bt is ubiquitous in the environment and can be isolated from soil, foliage, water and air. The species is distinguished from *B. cereus* by its ability to produce a protein crystal during sporulation (Höfte and Whiteley, 1989; Martin, 1994).

Bt was first isolated by the Japanese bacteriologist S. Ishiwata from diseased silkworm *Bombyx mori* (L.) larvae in 1901. In 1911, E. Berliner in Germany recorded the first scientific description of the bacterium. In 1916, Aoki and Chigasaki found that its activity was due to a toxin present in sporulated cultures, but not in young cultures of vegetative cells (Beegle and Yamamoto, 1992).

3.1. Bt δ-endotoxins and mode of action

Bt produces a parasporal inclusion body during sporulation usually referred to as a crystal. This crystal is made of proteins. A large number of related crystal proteins are known and more than one protein type can co-assemble in one crystal. In an effort to overcome a somewhat confused situation, a classification of crystal proteins and their genes was proposed (Höfte and Whitely, 1989). This classification is based on the crystal protein structure and on the host range. More than 14 distinct crystal protein (*cry*) genes are described, and recently additional insecticidal proteins have been identified (Lereclus et al., 1993).

The genes specify a family of related insecticidal (Cry) proteins, and are divided into four major classes: Lepidoptera-specific (I), Lepidoptera- and Diptera-specific (II), Coleoptera-specific (III), and Diptera-specific (IV) genes. A number of subclasses, based on insecticidal and structural properties, are also recognized within each class. More recently a newer classification system based solely on amino acid identity was proposed (Crickmore et al., 1998). The new classification allows closely related toxins to be ranked together and removes the necessity for researches to bioassay each new toxin against a growing series of organisms.

The crystal proteins exert their effect on the host by causing lysis of midgut epithelial cells, which leads to gut paralysis. The insect stops feeding and if it does not recover eventually dies. Upon ingestion, the crystals dissolve in the alkaline environment of the host insect midgut. The solubilized crystal protein or protoxin is proteolytically processed to produce the actual toxic fragment (toxin). The toxin binds to specific receptors present on the membranes of epithelial midgut cells. Finally, the membrane-bound toxin induces the formation of pores in the midgut epithelial cell membrane. As a result of pore formation the cells die, eventually leading to death of the larvae (Aronson et al., 1986; Höfte and Whiteley, 1989; Lereclus et al., 1989; Adang, 1991; Gill et al., 1992; Bauer, 1995).

From the Bt crystal protein's mode of action, it can be inferred that at least four parameters are involved in crystal protein function: 1) effectiveness of solubilization, 2) efficiency of protoxin-toxin conversion, 3) specific membrane receptor binding, and 4) membrane pore formation. All these parameters determine the specificity of a crystal protein (insecticidal spectrum).

3.2. Commercial use of Bt products

Bt has been applied to the environment since 1933, and first commercialized in France in 1938. However, it was not successfully commercialized until the 1950s, when the new technology of deep tank aerobic liquid fermentation was used to produce spore and crystal preparations. Major applications of Bt have taken place in North America for the control of over 40 pest species in field, forest, orchard, vineyard, park and gardens (Burges and Daoust, 1986). The first commercial Bt formulations were available for field testing in the United States in 1958 (Faust, 1974). In 1961, Bt subsp. *kurstaki* (Btk) was used as a biopesticide for the control of susceptible lepidopteran pests. Most Bt-based insecticides are formulated mixtures of δ-endotoxin crystals and Bt spores, which are known to synergize the toxicity of the crystals. Although the effectiveness of these early Bt-based insecticides was often erratic, progress was slow in research and development of improved Bt formulation, delivery, and application technologies, as well as in the discovery of more active strains. The market was dominated by products based on the HD-1 isolate of the *kurstaki* subspecies for the control of lepidopteran pests in forestry and agriculture. Until the mid-1970s, it was generally accepted that lepidopterans were the only targets of Bt.

New markets were opened by the discovery in 1976 of the *israelensis* subspecies, which is toxic to larval mosquitoes and black flies (Goldberg and Margalit, 1977), and the discovery of Bt subsp. *tenebrionis*, which is toxic to several beetle species (Krieg et al., 1983). These discoveries stimulated sudden and dramatic commercial interest in Bt (Van Frankenhuyzen, 1993). Lambert and Perferoen (1992) estimated that 40,000 strains of Bt are now stored, mainly in private collections, worldwide.

Currently, registered subspecies include Bt subsp. *kurstaki*, Bt subsp. *aizawai*, Bt subsp. *israelensis*, and Bt subsp. *tenebrionis* (equivalent to subsp. *san diego*), which display predominantly subspecies-related insecticidal activity against lepidopteran, dipteran, and coleopteran insect species, respectively (Table 1, page 11). The short half-life of Bt, due to ultraviolet inactivation when topically applied, has stimulated considerable research into alternative delivery strategies. By far the most controversial strategy is the use of insect-resistant transgenic crops expressing Bt δ-endotoxin genes.

This review paper focuses on sprayable Bt products commercially available. Consequently transgenic plants, plants that have been genetically transformed with a Bt δ-endotoxin genes, are not included in this study. Likewise Bt varieties producing ß-exotoxin are not included. Since 1971, Bt varieties producing ß-exotoxin are no longer registered for the control of insect pests.

CHAPTER I
ECOLOGICAL IMPACTS

1. Environmental fate of Bt

Persistance of Bt in the environment is important from both an ecological and economical points of view. This is reviewed by Otvos and Vanderveen (1993).

1.1. On foliage

Persistence of Bt on foliage is dependent on many environmental factors. Leong et al. (1980) conclude that sunlight exposure, leaf temperature and vapor pressure deficit contribute most to endospore decay. Sunlight, particularly ultra-violet radiation, inactivates 50% of Bt spores within 30 minutes and 80% within 60 minutes (Krieg, 1975). The inactivation of both spores and crystals is believed to be due to the production of peroxide or peroxide radicals following UV irradiation of the amino acids (Ignoffo and Garcia, 1978). Spores in absence of moist rapidly decay by exposure to sunlight, and thus are very susceptible in very dry conditions (Pinnock et al., 1971). In general, Bt loses 50% of its insecticidal activity in 1-3 days, often necessitating a second spray application for insects such as the Gypsy moth (*Lymantria dispar* Linnaeus), spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clemens and *Choristoneura occidentalis* Freeman) and jackpine budworm (*Choristoneura pinus pinus* Freeman). In some studies (McLeod et al., 1983, Beckwith and Stelzer, 1987) longer residual activities (10 days) have been reported. Some viable endospores of Btk have been recovered from foliage one year after ground application of Btk (1 Billion International Units (BIU)/tree) (Reardon and Haissig, 1984).

1.2. In soil

Bt is an indigenous soil bacterium with a worldwide distribution (Martin and Travers, 1989). The vegetative form of Bt is generally not well adapted to soil, and it requires the specialized habitat of vulnerable insects to persist. Bt endospores, however, can survive in most types of soils although at pH below 4.8, Bt will not grow (Saleh et al., 1970). Repeated application of Bt results in no increased accumulation of the organism (Dulmage and Aizawa, 1982). The fate of Bt in soil is likely dependent on microbial competitions. The abundance of Bt rapidly diminishes in unsterilized soils but may increase in sterilized soils (Akiba et al., 1977). When soil was treated at 10^7 cells per gram, Bt persisted at 10^3 cells per gram for 12-16 months. However, the proportion of Bt compared to other soil bacilli was reduced from 20-40% to about 10% indicating that Bt is not well-adapted to soil environments. Pruett et al. (1980) have shown that in soil, although 38% of the endospores remained viable after 63 days, only 3% of the insecticidal activity remained. After 135 days, there were 23% of the original spores and no insecticidal activity.

The movement of Bt away from the site of application (dissemination) is an important factor that may influence possible impact. Martin and Reichelderfer (1989) studied dispersal of Bt using antibiotic-resistant, marked strains. No vertical movement through soil deeper than 6 cm was observed and movement outside the plot were less than 10 m. DeLucca et al. (1981) also showed that Bt does not move in the soil, as two serotypes sprayed in close proximity did not become cross-contaminated. No evidence of genetic exchange was noted, although potential for exchange might be limited in soil under circumstances where Bt can multiply (Meadows, 1993).

1.3. In water

In Nova Scotia, operational spray programs (4.7-9.4 l/ha of Thuricide 16B) showed that Btk could be found in stream and reservoir water for 8-12 days after spraying (Menon and De Mestral, 1985). They also tested the survival patterns of Btk in laboratory in four different types of water conditions: distilled-deionized water, tap water, lake and sea water. Approximately 30% of Btk survived after 70 days in distilled and tap water. In lake water, approximately 50% of cells remained viable after 70 days. In contrast, approximately 90% of Btk population died off after 30 days exposure to sea water and less than 10% of Btk cells survived after 40 days. The prolonged survival of Btk in lake water is believed to be due to the presence of higher concentrations of available nutrients.

2. Effects of Bt on soil

Changes in soil productivity and fertility due to Bt are not likely because of Bt's natural occurrence in soil, lack of accumulation, and relatively short persistence (USDA, 1995).

3. Effects of Bt on water

Bt may enter water (streams, rivers, lakes, seas) through direct application to surface water, runoff, or through the feces of animals who have ingested Bt. Water quality should not be directly affected by Bt, as it is not likely to affect most aquatic organisms. Decreases in detritus decomposition rates demonstrated at high doses of Btk in the laboratory are unlikely in the environment, given the lower doses used and the purification processes in natural systems (Kreutzweiser et al., 1993). Btk spraying program in Nova Scotia detected Btk in a municipal water system during the application. This implies that chlorination of water supply was not sufficient to kill Btk (Menon and De Mestral, 1985). Therefore, it is possible that a small amount of Bt may enter public water supplies as a result of aerial spraying programs in areas that contain water catchments or water supply reservoirs. Bt contamination may also occur if spray enters air vents of local drinking water distribution reservoirs. However, the presence of Bt in water is not considered to cause any adverse effects on human health as it is not a human pathogen. Nevertheless, people may be concerned about the presence of bacteria in water supplies.

4. Effects of Bt on plants

Phytotoxicity from Bt (adverse effects on plant health) has never been observed at field rates of application (USDA, 1995). In order for Bt to have toxic effects, it must be ingested by an organism and

exposed to appropriate digestive enzymes at pH of 9.0 to 10.5 (Falcon, 1971). Therefore, plants (terrestrial and aquatic) could not be affected by Bt since they have no mechanism for ingesting the bacteria and for processing the crystal or the δ-endotoxins..

Plants that are pollinated exclusively or mainly by moth and butterflies may experience a temporary drop in seed set. However, plants are unlikely to be affected by reduced pollination, as even the plant which were solely reliant on moth or butterfly pollination would be able to be pollinated by species which were not at vulnerable instar stages when spraying took place (Operation Ever Green, 1997).

Applying Bt reduces damage to trees from leaf-eating caterpillars soon after ingestion of crystal. If the trees do not have to produce a new set of leaves to replace those eaten by caterpillars, tree can produce more products of photosynthesis to be used in tree growth and reproduction rather than forming a new set of leaves. Bt use, therefore, is likely to maintain the plant condition.

5. Effects on non-target invertebrates

Non-target organisms may be exposed to Bt either directly by encountering it in the environment (e.g. by eating leaves, litter, or the uppermost layer of the soil) or indirectly, by eating caterpillars which have been infected with Bt. Although Bt has a half-life in the environment of 12-32 hours, it has an insecticidal activity of a week or longer (USDA, 1995). Bt is therefore not expected to affect caterpillars other than the generation that is present when it is sprayed.

5.1. Soil microorganisms

Research concerning the effects of Bt on the soil microflora is limited, and results from the few studies that have been conducted are contradictory (Addison,1993). For instance, Pruett et al. (1980) reported increases in soil microbial numbers 2-4 weeks after using formulated product containing Bt subsp. *galleriae*. Petras and Casida (1985) reported similar results using Btk. On the other hand, Atlavinyté et al. (1982) measured a reduction in bacterial and actinomycete numbers and a rise in fungal numbers following the addition of Bt subsp. *galleriae* in a formulated product. Visser et al. (1994) cite a paper by Krieg (1983) indicating no significant effects of Btk on indigenous soil bacteria populations. From the experiments with DiPel® 176 in simple microcosms, Visser et al (1994) concluded that it is doubtful that Bt would have a significant impact on the non-target microflora under field condition.

5.2. Non-target Lepidoptera

Laboratory studies indicate that Bt is active against many micro- and macro-lepidopterans (Krieg and Langenbruch, 1981; Navon, 1993). There have been relatively few attempts to document the effects of Bt on native lepidopteran communities under field conditions. Morris et al. (1975) found that Bt applications against spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens, caused a 70% reduction in populations of the lepidopteran defoliator, *Dioryctria reniculelloides* Mutuura & Munroe. Miller (1990) demonstrated that both richness and diversity of native Lepidoptera associated with Garry oak, *Quercus garryana* Dougal., were reduced after three aerial applications of Bt in Oregon. Johnson et al. (1995) found that early instar swallowtail butterflies in the genus *Papilio* were sensitive to Bt-treated foliage up to 30 days after application. Recently, Wagner et al. (1996) reported similar result and they concluded that although the effects to most lepidopteran species were transparent, the lepidopteran fauna was not eliminated by a single spring application of Bt at 90 BIU/ha. Miller (1990) noted significant reductions in species richness of Lepidoptera larvae collected in sprayed areas the year of treatment and one year after treatment, but not two years after. Factors which influenced the ability of non-target species to recover included the stage of larval development at the time of spraying, the number of generations in a year, and the insect's ability to disperse (Miller,1990). Permanent changes in non-target lepidopteran populations do not appear likely except, possibly, in habitats that support small isolated populations of Lepidoptera that are highly vulnerable to Bt. This is particularly so if there may be physical or biological barriers which prevent the insect from moving back into the sprayed area (USDA, 1995).

5.3. Honey bees

Many studies have been carried out on the effect of Bt on honey bees (Cantwell et al., 1972; Davidson et al., 1977; Lehnert and Cantwell, 1978; Vandenberg and Shimanuki, 1986; Vandenberg, 1990). No investigator has reported adverse effects on the bee colony when Bt was sprayed on foliage and bees were exposed to it under field or simulated field conditions. Very high concentrations (10^8spores/ml sucrose syrup) of Bt subsp. *tenebrionis*, which is used against beetles such as the Colorado potato beetle, reduced longevity of honey bee adults but did not cause disease (Vandenberg, 1990).

5.4. Other invertebrates

Addison (1993) indicated some soil invertebrates (nematodes, ground beetles) might also be at risk. All tested strains of Bt were toxic to eggs of the nematode, *Trichostrongylus colubriformis*. However, populations of other nematode species were increased following the field application of Bt. Bt applications were found to reduce populations of a species of predatory mite that is closely related to soil-dwelling species (Addison,1993).

In a review of the effects of Bt on other soil organisms, some species of earthworms were unaffected by Btk (Dipel) applied to ash-maple forest soils at 6000 mg/m^2, 100 times more than the recommended rate (Benz and Altweg, 1975).

Invertebrate parasites and predators that feed on Bt-infected insects may experience temporary drops in population numbers. However, this drop would be due to lack of food supply, rather than Bt toxicity. Giroux et al. (1994a, and 1994b) indicated no direct effects on the adult and larval instars of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coccinellidae) from the use of Bt subsp. *san diego* commercial product (M-One™), in laboratory. Meanwhile, Flexner et al. (1986) cited the direct mortality of *Coccinella septempunctata* Linnaeus in laboratory, using Bitoxibacillin®, Entobakterin®, and Exotoxin®, however, other Bt formulations (e.g., Dipel® and Thuricide®) tested against *C. septempunctata* and

other coccinellids have had little or no effect. Direct mortality of parasitoids has been observed by Muck et al. (1981). They tested the ichneumonid parasite *Pimpla turionellae* Linnaeus and the braconid parasite *Cotesia glomeratus* Linnaeus with Btk (Dipel®). They found that high concentrations applied orally (e.g., 10^9 and 10^8 spores/ml) significantly increased the mortality of *C. glomeratus* after 2 weeks. *Pimpla turionellae* was less affected than *C. glomeratus*. However, the rate at which Bt formulations are used in the field is lower than most of those used to initiate high mortality of adult parasites in the laboratory research. Thus, the probability that adult parasites would consume lethal doses of Bt while searching for hosts and nectar feeding within Bt-sprayed field might be very low.

No negative impacts were observed with invertebrate predators (Plecoptera, Odonata, Megaloptera, Trichoptera, Diptera) from the test of Bt subsp. *israelensis* (Bti) over a three year period in the field and laboratory by Merritt and Wipfli (1994). A summary of Bti safety tests on vertebrate and invertebrate non-target organisms compiled by the company Biochem Products (anonymous, undated) showed that, other than producing mortality in some species of flies and midges, no ill effects were detected in close to 100 different non-target invertebrates. Similar results were obtained by Garcia et al.(1980).

5.5. Aquatic invertebrates

Eidt (1985) evaluated the toxicity of Bt subsp. *kurstaki* (Btk) (Thuricide® 32) to aquatic insects and concluded that there was no hazard to fish-food organisms in streams from Btk aerial spray at rates adequate for spruce budworm control. In a monitoring program of a stream in Algonquin Park, Ontario, Buckner et al. (1974) found that Btk had no measurable effect on Trichoptera (caddisflies), Ephemeroptera (mayflies), Plecoptera (stoneflies), Odonata (dragonflies), Coleoptera (water beetles), Diptera (flies), Turbellaria (planaria, flatworms), Nematoda (nematodes, roundworms), Oligochaeta (earthworms), Hirudinea (leeches), Amphipoda (crustaceans), Decapoda (crayfish), Hydracarina (water mites), Gastropoda (snails) and Pelecypoda (clams, mussels). The effects of Btk on aquatic invertebrates were also summarized by Otvos and Vanderveen (1993). They concluded that Btk does not adversely affect the abundance and composition of benthic insects.

Bt subsp. *israelensis* (Bti) is highly toxic to certain Diptera (mosquitoes and blackflies) larvae upon consumption. Before large-scale use of Bti against mosquitoes, such as in the Upper Rhine Valley in the early 1980s, numerous safety tests on aquatic organisms were carried out. None of the tested taxa appeared to be affected when exposed in water containing large amounts of Bti (Merritt, 1989; Becker and Margalit, 1993). Within the Diptera, the toxicity exhibited by Bti is restricted to a few nematocerous families. Apart from larval mosquitoes and blackflies, only the closely related dixids are similarly sensitive to Bti. Larval psychodids, chironomids, sciarids and tipulids are generally far less sensitive. Other flies, such as the housefly, *Musca domestica* Linnaeus (Muscidae) and syrphids, such as *Helophilus pendulus* Linnaeus, are insensitive to Bti (Ali, 1981; Mulla et al., 1982; Back et al., 1985; Becker and Margalit, 1993). A trial conducted with a Bti product, Vectobac® 1200L, in Nova Scotia showed that there was no significant difference between pretreatment and post-treatment abundance of chironomid and simulid in the streams (McCracken and Matthews, 1997).

Merritt and Wipfli (1991) assessed indirect effects of Bti treatment with two black fly predators, *Nigronia serricornis* Say and *Acroneuria lycorias* Newman, and a detritivore, *Prostoia completa* Walker. They found that, although non-target organisms are not directly affected by Bti treatment, there are secondary consequences for non-target organisms, including predators and detritivores. They concluded that, since these insects are generalists, the effects of population suppression may be minor and the space vacated by black fly larvae may be taken up by other taxa that are suitable preys.

6. Effects on vertebrates

The effects of Bt formulations on animal health include direct effects of contact with Bt as well as indirect effects as a result of feeding on insects treated with Bt. Animals could be exposed to Bt-based insecticides through ingesting Bt on plants, ingesting insects infected with Bt, inhaling Bt spray, or through skin(dermal) contact with the spray. However, the mode of action of Bt indicates that there are no concerns about dermal contact and inhalation in animal (USDA, 1995).

The USDA (1995) provides a tabular summary on laboratory studies of toxicity of Btk to fishes, birds and mammals (Table 2, page 12).

Meanwhile, the changes in the food chain due to Bt applications could apply some environmental stresses on some animals that rely mainly on insects for food source.

6.1. Fishes

There has been no documented evidence of fishes killed as a result of the many forestry, agricultural and urban Bt spraying programs in Canada and US in the last 20 years (USDA, 1995). In reviewing the toxicity of Bt to fish, Forsberg et al. (1976) cite several studies conducted with older formulations of Bt and give toxicity values. It was unclear, however, whether or not these older Bt formulations contained ß-exotoxin. Presence of ß-exotoxin was not assessed at that time. Consequently reports of toxicities detected in these earlier studies must be analysed with caution. For the formulated product Thuricide, known at that time to contain ß-exotoxin, the studies reported no mortalities at 600 ppm or lower. Since this formulation contained ß-exotoxin, now known to be toxic to vertebrates, they represented toxicities significantly greater than those of modern Bt formulations which are ß-exotoxin-free.

In addition to the direct toxicity to fishes, indirect effects, such as what happens to fishes after they consume the cadavers of Bt-infected insects, are to be considered (Forsberg et al., 1976). No evidence exists that consumption of Bt-infected insects have adversely affected fishes to any noticeable degree (Surgeoner and Farkas, 1990)

6.2. Amphibians and reptiles

No references were found which indicated any direct adverse effect on amphibians and reptiles. These animals eat a combination of insect species and small invertebrates. Lepidoptera would form a

rather small portion of their daily diet. Therefore most amphibians and reptiles are unlikely to be affected by Bt (USDA,1995).

6.3 Birds

There have been no significant reductions in bird populations (74 species representing 21 families) noted in areas treated with Bt in Canadian spruce-fir forest treatment plots, located in Manitoba and Ontario (Buckner et al. 1974). Weber (1993) indicated that there would be negligible mortality of adult birds and the most severe potential effect would be a localized decrease in breeding success of a few species which are most highly dependent on Lepidoptera for food.

Several field studies have examined the effects on insectivorous birds, including neotropical migrants, when food resources were reduced by the application of Bt (Rodenhouse and Holmes, 1992; Gaddis, 1987; Gaddis and Corkran, 1986). Rodenhouse and Holmes (1992) observed a significant reduction in the number of nesting attempts per bird per year, and in the number of caterpillars in the diets of black-throated blue warblers (*Dendroica caerulescens*, a neotropical migrant) in sprayed plots. There was no significant difference in the number of production of young per territory per season per pair despite fewer nesting attempts by birds on treated plots. No difference was noted between treated and control areas in caterpillar abundance 2 years after treatment. Gaddis (1987) and Gaddis and Corkran (1986) tested the reproductive success and feeding activities of chestnut-backed and black-capped chickadees near Portland, Oregon. They found no difference between treated and control sites in reproductive success or nestling growth measures in the first year. In the second year, however, they found a significantly lower fledgling success at treatment areas. Although significantly smaller proportion of caterpillars brought as food on treatment sites both years, the provision rate was not different. Therefore, the relationship between the application of Bt and the nest failures was uncertain. The USDA concluded that field studies show the effects of Bt spraying on insectivorous birds to be "subtle" (USDA, 1995).

6.4. Mammals

Some of the early safety studies to mammals were complicated by the presence of ß-exotoxin in the Bt preparations: strains containing ß-exotoxin have been banned in the United States since 1971 (Ignoffo, 1973). There are many references dealing with the possibility of toxicity or pathogenicity of Bt products, showing that these entomopathogens were virtually non-toxic to mammals provided that high dose levels were not used.

According to the World Health Organization (WHO)'s guidelines for assessing the safety of bacterial agents (Anonymous, 1981), in addition to the aforementioned tests (e.g. oral, intraperitoneal, respiratory, dermal and allergenicity and hypersensitivity), the recommended safety tests that have to be passed by bacterial pest control agents also include eye exposure (with rabbits) and in vitro mutagenicity tests. Bt has passed these as well, in addition to a subcutaneous and 3-week feeding study. Rogoff (1982) provides a history of regulatory safety data required for Bt to satisfy the needs of the Environmental Protection Agency (EPA).

One field study in Canada (Buckner et al., 1974) indicated that small mammals (woodland jumping mice, deer mice, short-tailed shrews, common shrews, red-backed voles and eastern chipmunks) continued breeding through the treatment periods, and trapping data indicated that the application of Bt treatments did not harm the small mammal complex inhabiting treatment areas.

Using commercially available preparations (Abbott Laboratories, North Chicago, Ill.), Siegel et al. (1987, 1990) demonstrated the safety of formulated products containing Bti in rats, mice and rabbits. There was no evidence that Bti infected rats and mice because recovery of colony-forming unit (CFU) decreased rather than increased over time. An intact immune system was not requisite to prevent infection because recovery of Bti decreased with time in both corticosteroid-treated euthymic mice and athymic mice. They concluded that Bti is avirulent and noninvasive to mammals, and that it can be used safely in environments in which human exposure is likely to occur.

Although highly toxic to Colorado potato beetle, acute toxicology tests have demonstrated that Bt subsp. *tenebrionis* is not toxic to mammals (Mycogen Corporation, Tier I toxicology tests)

7. Effects on human beings

Bt has been the subject of a very limited number of experiments on humans (Otvos and Vanderveen, 1993). In one study, 18 human subjects ingested one gram of a commercial Bt subsp. *thuringiensis* product in capsules daily for five days. Five subjects also inhaled 100 mg of the powder daily for five days. No adverse health effects were noted on physical, laboratory, or x-ray examination (Fisher and Rosner, 1959). In this experiment, humans have been exposed to 10^9 spores Btk/kg by inhalation and 10^{10} spores Btk/kg orally. These levels of exposure are many orders of magnitude higher than the levels to which members of the public could be exposed during an aerial spraying program.

There is only one case of human disease associated with Btk recorded in the medical literature. This occurred after a previously healthy 18-year-old farmer splashed a commercial product (DiPel®) into his eye. The patient was treated with antibiotic ointment. Three days later, when the eye was still irritated, he was treated with a corticosteroid ointment. Ten days after the accident, a corneal ulcer was discovered and was successfully treated with subconjunctival injections of gentamicin and cefazolin sodium. Bt was cultured from the corneal ulcer. After two weeks of topical treatment with gentamicin the ulcer had healed (Samples and Buettner, 1983). The authors attributed the ulceration to Btk infection, but did not entertain the alternate hypothesis that the Btk only inhabited the corneal ulcer that could have been caused by other factors.

In case of Bti, Warren et al. (1984) report on a graduate student who developed infection after accidental injection of Bti and *Actinobacter calcoaceticus* into his finger. In this case also antibiotic treatment resulted in complete recovery within a few days.

Two detailed epidemiological studies have been carried out on the exposure of the general public to Btk in Canada and USA. The

most likely routes of exposure for the general public are oral, dermal, and inhalation. In addition to these routes of exposure, accidental parenteral or ocular exposures may occur in workers. In fact, a major study of workers in the Vancouver urban area spray program found that some people working on Btk ground spray programs, without protective clothing, developed minor irritations of skin, eyes and respiratory tract. These health effects tended to be transient and irritant in nature: dry skin, chapped lips, itchy, red and burning eyes, runny nose and nasal stuffiness. The symptoms were reported two to three times more frequently among ground spray workers than among the control group during the trial period. However, ground workers are likely to have greater levels of exposure to Btk than aerial workers or the general public. The exposure rates of the ground workers were up to 500 times the amount of Btk that a general public standing outside during the spray operation would be exposed to. Consequently, these effects are less likely to be observed in aerial workers or members of the general public after exposure to Btk (Nobel et al., 1992). The study also found that Btk persists in the nasal cavities of workers for up to four weeks (or longer in a minority of cases). No significant or serious health problems in spray workers resulted from Btk exposure and no loss of workdays could be attributed to Btk. A US study (Green et al., 1990) found that ground workers using spraying equipment had low levels of cumulative exposure to Btk during the spray period, and aerial workers had levels of exposure only slightly higher than those of the general public (USDA, 1995). Finally, US authorities have concluded that "on the basis of both the available epidemiological studies as well as the long history of use, no hazard has been identified for members of the public exposed to Btk formulations" (USDA, 1995).

8. Evolution of resistance

The continued efficacy of Bt-based insecticide for many years, until the mid-1980s, without any resistance being reported led to considerable skepticism that resistance to Bt was possible (Burges, 1971; Krieg and Langenbruch, 1981; Boman, 1981). It was suggested that multiple effects on the host insects or evolutionary advantages of the pathogen might preclude or greatly reduce the likelihood of insects becoming resistant to Bt. However, as the last decade has shown, resistance to Bt δ-endotoxins develops readily in many species of insect pests, both in the laboratory and in the field (McGaughey, 1985; McGaughey and Beeman, 1988). Tabashnik et al. (1990) presented the first well documented instance of resistance occurring against Btk in the field, although earlier reports had suggested the possibility of Btk resistance in populations of *Plutella xylostella*, in the Philippines (Kirsch and Schmutterer, 1988). Statistically significant resistance to Bti has been reported in mosquitoes *Culex quinquefaciatus* Say and *Aedes aegypti* Linnaeus (Georghiou et al., 1983; Goldman et al., 1986). At least one strain of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say has been selected for resistance to a Coleoptera-active strain of Bt subsp. *tenebrionis* (Miller et al., 1990).

The genetic capacity of insect populations to evolve resistance to Bt δ-endotoxins is now well recognized from the study of the many insect populations selected for resistance to Bt in laboratory (Van Rie et al., 1990; McGaughey and Whalon, 1992; Whalon and McGaughey, 1993; Tabashnik, 1992 and 1994; Tabashnik and McGaughey, 1994; Estada and Ferré, 1994; McGaughey and Johnson, 1994; Van Frankenhuyzen et al., 1995, etc). The summarized results are 1) Bt resistance alleles are present at varying levels in different insect species and populations, 2) within a single species, the genetics, mechanisms, level, and stability of resistance vary between selected populations, 3) selection with a blend of toxins can select for resistance to each toxin in the blend, 4) resistance occurs more rapidly with purified toxins than with spore/crystal preparations, 5) cross-resistance to δ-endotoxins is almost ubiquitous and often unpredictable, and 6) reselection of revertant populations is rapid (Bauer, 1995).

Presently, much of the effort toward resistance management or avoidance seems to focus on the presumption that there is an almost unlimited number of different Bt toxins available in nature and that resistance can be managed by using these in various mixture, mosaic, rotational, or sequential systems (Tabashnik, 1994). The implementation of integrated pest management (IPM) strategies that optimize the goals of resistance management involves 1) diversifying the sources of mortality to avoid selection for a single mechanism, 2) reducing selection pressure for the major mortality factor, 3) maintaining susceptible individuals by providing refuges and encouraging immigration, 4) monitoring for increasing resistance to any one of the mortality agents, and 5) responding to resistance through management strategies designed to reduce the frequency of the resistance trait (Whalon and McGaughey, 1993).

CHAPTER II
ECONOMICAL IMPACTS

Accurate economic information on the benefits of specific pesticide-use plans is needed by both growers and consumers to ensure that the maximum benefit is being achieved with the minimum risk. This information can take the following two forms: 1) proof that the standard commercial programs are maximizing yield while minimizing unnecessary use and 2) clear economic information on the benefit of use of alternative programs relying on pesticides with low mammalian toxicity that have broad legislative or public acceptance, or both.

Investment in pest control by pesticides has been shown to provide significant economic benefits. Pesticides may cost 4 to 11% of the gross cash value of a crop. Without crop protection chemicals, it was estimated that crop production would decline 15%, marginal land would be converted to row crops, and food costs would increase $228 per household annually (Smith and Lacewell, 1996). Money returns for the direct benefits to farmers have been estimated to range from $3 to $5 for every $1 invested in the use of pesticides (Headley, 1968; Pimentel et al., 1978). However, these figures do not reflect the indirect costs of pesticide chemical use such as human pesticide poisonings, reduction of fish and wildlife populations, livestock losses, destruction of susceptible crops and natural vegetation, honey bee losses, destruction of natural enemies, evolved pesticide resistance, and creation of secondary pest problems (Pimentel et al., 1980).

Bt-based formulations have been proven environmentally-friendly and safe for human beings as evidences in the previous chapter. In addition, Bt has low development costs compared with classical chemical pesticides. Traditionally, less than 1% of the cost of developing chemical pesticides has been spent on insect pathogens. The discovery rate of novel Bt strains of insecticidal crystal proteins is rather higher (1 in 1000 screens) than synthetic pesticides (1 in 20,000 screen compounds) (Lambert and Perferoen, 1992).

Trumble et al, (1997) studies on celery plantings in 1992 and 1993 (experimental plantings) and 1995 (commercial field) compared the benefit of current chemical standard pesticide practice with an integrated pest management program based on Bt. In 1992 and 1993, net profits with the use of Bt were $1,485 and $614/ha higher, respectively, than the standard chemical treatment. On a commercial celery operation, in 1995, the use of Bt generated a net profit more than $410/ha higher than that of the grower's chemical treatment. It also reduced pesticides use by 40% compared to most celery producers' use. A similar result was obtained from a study on fresh-market tomatoes. The net profits were higher by $500 to $1000/ha with the use of Bt as compared with the standard chemical treatment.

In the early 90s, Rigby (1991) estimated the global market for Bt-based bioinsecticide to be in the range of $100 million (North America: $57.2 million, Far East: $24 million, Middle East/Africa: $12.9 million, South and Central America: $8.1 million, Australasia: $2.1 million, Western Europe: $0.7 million). It did not include the use of Bt in former USSR and Eastern Europe. At present, a wide range of conventional Bt-based products are available for control of insect pests and the use of these products is still growing. In 1996 and 1997, Mycogen Corp. revenues from Bt-based formulations sales were $45.9 million and $40.5 million respectively. In 1997, the European biopesticide market had an estimated value of $102 million, expected to reach $167.2 million by the year 2004 (Anonymous, 1997). At present, the global insecticide market is estimated at 8 billion dollars annually and there is a very strong indication that biological insecticides will account for almost $500 million by the year 2000 (Georgis, 1996).

CHAPTER III
SOCIO-CULTURAL IMPACTS

1. Consumers response

Consumers have come to depend on inexpensive food, largely as a result of highly efficient production in agriculture. However, consumers also expect safe food and have become concerned about freedom from residues, the safety of their water, and the general bio-sustainability of their environment. Many advocates have raised major questions about these and related issues, which were reflected in the content and focus of recent congressional legislation in the United States. A recent U.S. poll (Morris et al., 1993) found that 91% of consumers are concerned about pesticides and chemicals used to grow food products, and 95% are concerned about pesticides and fertilizers getting in their water supply. Nine out of ten consumers believe it is important that U.S. farmers switch to low-chemical production strategies that rely primarily on natural methods and use chemicals only as a last resort. Most consumers say they would be willing to pay somewhat more for food grown with reduced levels of chemicals, and 79% would like to see more signs in supermarkets labeling food grown with less chemicals.

Bt is frequently used by the food industry to control insect pests. In Vancouver, operational spray program (Foray 48B, Btk) analyzed food samples for Btk. The researchers could cultivate Btk from a variety of vegetables during and after the spray program. They concluded that it was most unlikely that all of the Btk on the food came from the aerial spraying program (Noble et al., 1992). In addition, effects of the presence of Bt in food on human health appear to be negligible as Bt does not grow in warm blooded organisms and passes through the digestive system without producing any toxic effect. Because of these characters and non-toxicity to environment, Bt-based formulations have been a main component in integrated pest management programs.

A recent study (Anderson et al., 1996) concluded that a high percentage (85%) of customers would rather buy integrated pest management program-based grown food, and would be willing to support reduced pesticide chemical use in hopes of positive consequences for human health and environmental quality.

2. Public response to spraying

People who live near trees or farms could be exposed to Bt spraying. Other people who work in the woods or with trees, mix or apply insecticides, or work in laboratories with the Bt commercial products could have frequent exposure to the Bt commercial products. People's perceptions and behaviors in response to the insect treatment with Bt may vary depending on where people live. People in suburban and rural areas are more likely to encounter and be alarmed by insect pests. In general, people in rural agricultural areas are less likely to be concerned about spraying for pest control because of their familiarity with spraying of agricultural crops. Surveys of public opinion carried out as part of the US environmental impact assessments on the management of Gypsy moth (USDA, 1995) identified that people were anxious and fearful about the appearance of helicopters and planes used to spray insecticides. Some people have fear or anxiety about the safety of insecticides and distrust government actions to control insects. Some people were concerned about possible risks of spray projects, namely insecticide spills, airplane accidents, automobile accidents, and the exposure of spray workers to insecticides, traffics, powerlines, aggressive dogs, and other neighborhood or woodland conditions. Finally, the document emphasized the importance of communication, education and advanced notices to the public during spray operations to reduce people's anxieties.

CONCLUSIONS and PROSPECTS

The advantages of Bt are numerous and include: fast larvicidal activity, production on relatively inexpensive media, long shelf life, application using conventional equipment and minimal to no effects on beneficial insects and other non-target organisms. Numerous studies gave informations on the successful use of Bt in crop and forestry protection. The possibilities of integrating Bt with other biological control agents, culture practices and conventional pesticides, have increased considerably with the availability of novel toxins with broader host ranges, improved formulations and various options for their application. Indeed, Bt has become the cornerstone of several integrated pest management programs particularly in vegetable crops where chemical pesticides residues are a major concern.

Several factors may significantly increase the use of Bt in the future, in particular, the increase in social costs associated with the heavy use of chemical pesticides and the rapid escalation of direct costs of development and production of newer chemical insecticides. In the future, certainly, there will be a continuing interest in discovering novel Bt strains. Ongoing novel Bt screening programs will reveal new activities in terms of increased toxicity as well as new spectra of activity. In addition, the most effective way of treatment will continue to be a subject of research. Undoubtedly, improvements are also expected from the discovery of novel strains carrying novel, more efficient combinations of insecticidal toxins or from the development of novel combinations via recombinant DNA techniques. For example, companies in the Bt arena (e.g. Ecogen, Mycogen, and PGS, etc.) boast large collections of several thousand Bt isolates. Many new crystal types have been discovered with activity on mites, corn rootworms (*Diabrotica* spp.), nematodes, adult flies and ants. Many of these strains are still being characterized, and the potential for use of these new Bt in the near future is promising.

Table 1. Commercial products based on *Bacillus thuringiensis*.

Subspecies	Manufacturer	Product
kurstaki	Abbott Laboratories	Boibit, DiPel, Foray
	Bactec Corp.	Bactec Bernan
	Becker Microbial Products, Inc.	BMP 123
	Ecogen Inc.	Condor, Crymax, Cutlass, Raven
	Forward International Ltd.	Forwabit
	Thermo Trilogy	Costar, Javelin, Thuricide, Vault
	Sanex Inc.	Bactosid K
	Tecomag	Agrobac
	Troy Biosciences Inc.	Troy-BT
	Mycogen Corp.	MVP, MVP II, M-Peril
israelensis	Abbott Laboratories	Bactimos, Gnatrol, Skeetal, VectoBac
	Becker Microbial Products, Inc	Aquabac, Aquabac Primary Powder
	Sanex Inc.	Vectocide
tenebrionis	Abbott Laboratories	Novodor
	Mycogen Corp.	M-trak
aizawai	Abbott Laboratories	Xen Tari
	Thermo Trilogy	Agree, Design
	Mycogen Corp.	Mattch
morrisoni	Bactec Corp.	Bactec Bernan

(Adapted from Farm Chemicals Handbook, 1997)

Table 2. Toxicity data of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Species	Exposure/Dose	Effect
Mammals		
Human	Acute oral dose of 1 g/day for 3 consecutive days	No effect/infectivity
Rat	Acute oral dose	$LD_{50} \geq 4.7 \times 10^{11}$ spores/kg
Rat	Acute oral dose	$LD_{50} \geq 2.67$ g/kg
Mice	Acute oral dose of 10,000 mg/kg	no effect
Rabbit	Acute oral dose	$LD_{50} \geq 2.0 \times 10^{9}$ spores/animal
Dog	Acute oral dose of 10,000 mg/kg	no effect
Rabbit	Acute dermal dose (Dipel 6AF[a])	$LD_{50} > 2{,}000$ mg/kg
Rat	Acute inoculation dose	$LD_{50} \geq 3.4 \times 10^{11}$ spores/kg
Rabbit	Acute inoculation dose	$LD_{50} \geq 6.9 \times 10^{7}$ spores/kg
Rat	Acute inhalation dose	$LD_{50} \geq 8 \times 10^{11}$ spores/animals
Sheep	Oral diet of 500 mg/kg/day of Dipel D[a] or Thuricide-HP[a] (approx. 10^{12} spores per day) for 5 months	No toxicity or significant treatment-related effect (physical or clinical)
Birds		
Birds	Acute oral dose	LD_{50} = 178 ppm, NOEL= 1ppm
Bobwhite quail	Acute oral dose	$LD_{50} > 10{,}000$ g/kg
Mallard	Acute oral dose	$LD_{50} > 2{,}000$ mg/kg
Fishes		
Rainbow trout	96-hour exposure	NOEL > 1,000 ppm
Rainbow trout	96-hour exposure	$LC_{50} > 10$ mg/L
Bluegill sunfish	96-hour exposure	$LC_{50} > 95$ mg/L
Rainbow trout, bluegill sunfish, sheepshead minnow	30-day at 100 X maximum expected environmental concentration (MEEC) for label rates of Dipel	No adverse effects
Eel	2,000 X MEEC for label rates of Dipel	

(Adapted from USDA, 1995)

REFERENCES

Adang, M.J. 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action, and utilization. In: Biotechnology for biological control of pests and vectors (Edited by K. Maramorosch). CRC Press, London. pp: 3-23.

Addison, J.A. 1993. Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: A review. Can. J. For. Res. 23: 2329-2342.

Akiba, Y., Sikijima, Y., Atzawa, K., and Fujiyoshi, N. 1977. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis* II. Dynamics of *B. thuringiensis* in sterilized soil (English summary). Japanese J. Appl. Entomol. Zool. 21: 41-46.

Ali, A. 1981. *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (ABG-6180) against chironomids and some non-target aquatic invertebrates. J. Invertebr. Pathol. 38: 264-272.

Anderson, M.D., Hollingsworth, C.S., Van Zee, V., Coli, W.M., and Rhodes, M. 1996. Consumer response to integrated pest management and certification. Agri. Ecosys. Environm. 60: 97-106.

Anonymous undated. Bactimos™ for mosquito and black fly control, technical information. Biochem Products, Salisbury Laboratories, Inc. P.O. Box 264, 100 Rockland Road, Montchanin, DE 19710.

Anonymous 1981. Mammalian safety of microbial agents for vector control: a WHO memorandum. Bull. W.H.O. 59: 857-863.

Anonymous 1997. European biopesticide market will grow by 64% in next seven years. Intern. Pest Control 39(6): 180.

Aronson A.I., Beckman, W., and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50: 1-24.

Atlavinyté, O., Galvelis, A., Daciulyte, J., and Lugauskas, A. 1982. Effects of entobacterin on earthworm activity. Pedobiologia 23: 372-379.

Back, C., Boisvert, J., Lacoursière, J.O., and Charpentier, G. 1985. High-dosage treatment of a Quebec stream with *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*: efficacy against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non-target insects. Can. Entomol. 117: 1523-1534.

Bauer, L.S. 1995. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Florida Entomol. 78(3): 414-442.

Becker, N., and Margalit, J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 147-170.

Beckwith, R.C., and Stelzer, M.J. 1987. Persistence of *Bacillus thuringiensis* in two formulations applied by helicopter against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in north central Oregon. J. Econ. Entomol. 80: 204-207.

Beegle, C.C., and Yamamoto, T. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. Can. Entomol. 124: 587-616.

Benz, G., and Altweg, A. 1975. Safety of *Bacillus thuringiensis* for earthworms. J. Invertebr. Pathol. 26: 125-126.

Boman, H.G. 1981. Insect responses to microbial infection. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980 (Edited by H.D. Burges). Academic Press, New York. pp. 769-784.

Buckner, C.H., Kingsbury, P.D., McLeod, B.B., Mortensen, K.L., and Ray, D.G.H. 1974. Evaluation of commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* with and without chitinase against spruce budworm. F. Impact of aerial treatment on non-target organisms. Chemical Control Research Institute, Info. Rep. CC-X-59. Canadian Forestry Service, Ottawa.

Burges, H.D. 1971. Possibilities for pest resistance to microbial control agents. In: Microbial control of insects and mites (Edited by H.D. Burges and N.W. Hussey). Academic Press, New York. pp. 445-457.

Burges, H.D., and Daoust, R.A. 1986. Current status of the use of bacteria as biocontrol agents. In: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology (Edited by R.A. Samson, J.M. Vlak and D. Peters). Soc. Invertebr. Pathol., Wageningen. pp. 514-517.

Cantwell, G.E., Lehnert, T., and Fowler, J. 1972. Are biological insecticides harmful to the honey bee? Am. Bee J. 112(7): 255-258.

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature
Http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

Davidson, E.W., Morton, H.L., Moffett, J.O., and Singer, S. 1977. Effect of *Bacillus thuringiensis* strain SSII-1 on honey bees, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 29: 344-346.

DeLucca, A.J.II, Simonson, J.G., and Larson, A.D. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of United States. Can. J. Microbiol. 27: 865-870.

Dulmage, H.T., and Aizawa, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In: Microvial and viral pesticides (Edited by E. Kurstak). Marcel Dekker, New York. pp. 209-237.

Eidt, D.C. 1985. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to aquatic insects. Can. Entomol. 117:829-837.

Estada, U., and Ferré, J. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3840-3846.

Falcon, L.A. 1971. Use of bacteria for microbial control of insects. In: Microbial control of insects and mites (Edited by B.D. Burges and N.W. Hessey). Academic Press, New York. pp. 67-95.

Faust, R.M. 1974. Bacterial diseases. In: Insect Diseases (Edited by G.E. Cantwell). Marcel Dekker, New York. pp. 87-183.

Fisher, R., and Rosner, L. 1959. Toxicology of the microbial insecticide, Thuricide. Agri. Food Chem. 7: 686-688.

Flexner, J.L., Lighthart, B., and Croft, B.A. 1986. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. Agri. Ecosys. Environ. 16: 203-254.

Forsberg, C.W., Henderson, M., Henry, E., and Roberts, J.R. 1976. *Bacillus thuringiensis*: its effects on environmental quality. Natl. Res. Coun. Can. Publ. No. NRCC 15385, Ottawa.

Gaddis, P.K. 1987. Secondary effects of BT spray on avian predators: the reproductive success of chickadees-1987. Oregon Department of Agriculture, Plant Division Report, Salem.

Gaddis, P.K., and Corkran, C.C. 1986. Secondary effects of BT spray on avian predators: the reproductive success of chestnut-backed chickadees. Oregon Department of Agriculture, Plant Division Report 86-03, Salem.

Garcia, R., DesRochers, B., and Tozer, W. 1980. Studies on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against organisms found in association with mosquito larvae. Proc. Ann. Conf. Of the Calif. Mosquito and Vector Control Assoc. pp. 33-36.

Georghiou, G.P., Barker, J., Al-Khatib, Z., Mellon, R., Murray, C., Tran, H., Vasquez, M., Pelsue, F., and Hazelrigg, J. 1983. Insecticide resistance in mosquitoes: research on new chemical and techniques for management. In: Mosquito control research annual report. University of California, Riverside, pp. 86-91.

Georgis, R. 1996. Present and future prospects of biological insecticides. Conference on biological control. April, Cornell University. Http://www.nysaes.cornell.edu

Gill, S.S., Cowles, E.A., and Pietrantonio, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins. Ann. Rev. Entomol. 37: 615-636.

Giroux, S., Coderre, D., Vincent, C., and Côté J.-C. 1994a. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on predation effectiveness, development and mortality of *Coleomegilla maculata lengi* (Col.: Coccinellidae) larvae. Entomophaga 39(1): 61-69.

Giroux, S., Côté J.-C., Vincent, C., Martel, P., and Coderre, D. 1994b. Bacteriological insecticide M-One effects on predation efficiency and mortality of adult *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae). J. Econ. Entomol. 87: 39-43.

Goldberg, L.J., and Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles serengetii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37: 355-358.

Goldman, I.F., Arnold, J., and Carlton, B.C. 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecis *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquitoe *Aedes aegypti*. J. Invertebr. Pathol. 47: 317-324.

Green, M., Heumann, M., Sokolow, R., Foster, L.R., Bryant, R., and Skeels, M. 1990. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-1986. Am. J. Public Health 80: 848-852.

Headley, J.C. 1968. Estimating the production of agricultural pesticides. Am. J. Agri. Econ. 50: 13-23.

Höfte, H., and Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev., 53: 242-255.

Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. Ann. N. Y. Acad. Sci. 27: 141-164.

Ignoffo, C.M., and Garcia, C. 1978. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. Environ. Entomol. 7: 270-272.

Johnson, K.S., Scriber, J.M., Nitao, J.K., and Smitly, D.R. 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to three nontarget Lepidoptera in field studies. Environ. Entomol. 24: 288-297.

Kirsch, K., and Schmutterer, H. 1988. Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in the Philippines. J. Appl. Entomol. 105: 249-255.

Kreutzweiser, D.P., Capell, S.S., Thomas, D.R., and Wainio-Keizer, K.L. 1993. Effects of Btk on aquatic microbial activity, detrital decomposition, and invertebrate communities. NAPIAP Proj. NA-25. Sault Ste. Marie, Ontario: Forestry Canada, Forest Pest Management Institute.

Krieg, A. 1975. Photoprotection against inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet rays. J. Invertebr. Pathol. 25: 267-268.

Krieg, A. 1983. Bekämpfung von Insekten im pflanzenschutz mit *Bacillus thuringiensis*—Präparaten und deren einfluss auf die umwelt. 2. Mitteilung. Anz. Schaedlingskd. Pflanzenschutz Umweltschutz 56: 41-52.

Krieg, A., and Langenbruch, G.A. 1981. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980 (Edited by H.D. Burges). Academic Press, New York. pp 837-896.

Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A., and Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer gegenuber larven von Coleopteren wirksamer. Pathotyp. Z. Ang. Entomol. 96: 500-508.

Lacey, L.A., and Goettel, M.S. 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. Entomophaga 40(1): 3-27.

Lambert, B., and Peferoen, M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Bioscience 42: 112-122.

Lehnert, T., and Cantwell, G.E. 1978. The effects of microbial pesticides on the honey bee - A review. Am. Bee J. 118(10): 674-675.

Leong, K.L.H., Cano, R.J., and Kubinski, A.M. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. Environ. Entomol. 9(5): 593-599.

Lereclus, D., Bougouin, C., Lecadet, M.M., Klier, A., and Rapoport, G. 1989. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: Regulation of Procaryotic Development (Edited by I. Smith, R.A. Slepecky and P. Setlow). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp: 255-276.

Lereclus, D., Delécluse, A., and Lecadet, M.-M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 37-69.

Marrone, P.G. 1994. Present and future use of *Bacillus thuringiensis* in integrated pest management systems: an industrial perspective. Biocon. Sci. Technol. 4(4): 517-526.

Martin, P.A.W. 1994. An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. Am. Entomol. 40(1): 85-90.

Martin, P.A.W., and Traverse, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55(10): 2437-2442.

Martin, W.F., and Reichelderfer, C.F. 1989. *Bacillus thuringiensis*: persistence and movement in field crops. In: Proceedings and Abstracts; Society for Invertebrate Pathology XXII[nd] Annual Meeting, Univ. Maryland, USA, 20-24 August, 1989. p. 25.

McCracken, I.R., and Matthews, S.L. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* applications on invertebrates from two streams on Prince Edward Island. Environ. Contamin. Toxicol. 58: 291-298.

McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 229: 193-195.

McGaughey, W.H., and Beeman, R.W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 81: 28-33.

McGaughey, W.H., and Whalon, M.E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science 258: 1451-1455.

McGaughey, W.H. and Johnson, D.E. 1994. Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross-resistance in Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 87: 535-540.

McLeod, P.J., Yearian, W.C., and Young, S.Y. 1983. Persistence of *Bacillus thuringiensis* on second year lobolly pine cones. Environ. Entomol. 12: 1190-1192.

Meadows, M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 193-220.

Menon, A.S., and De Mestral, J. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in waters. Water, Air, and Soil Pollution 25: 265-274.

Merritt, R.W. 1989. A broad evaluation of B.t.i. for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget effects on invertebrates and fish. J. Am. Mosq. Contr. Ass. 5(3): 397-415.

Merritt, R.W., and Wipfli, M.S. 1991. Changes in feeding habits of selected nontarget aquatic insects in response to live and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac-killed black fly larvae (Diptera: Simuliidae). Can. Entomol. 123: 179-185.

Merritt, R.W., and Wipfli, M. 1994. Impact of Bti on non-target aquatic insects and trout. Http://www.msue.msu.edu/msue/imp/modet/61893002.html

Miller, J. C. 1990. Field assessment of the effects of a microbial pest control agent on non-target Lepidoptera. Am. Entomol. 36: 135-139.

Miller, D.L., Rahardja, U., and Whalon, M.E. 1990. Development of a strain of Colorado potato beetle resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. Pest Resistance Manage. 2(2): 25.

Morris, O.N., Armstrong, J.A., and Hildebrand, M.J. 1975. Laboratory tests and field trials of low volume aerial applications of *Bacillus thuringiensis*-Orthene combinations against spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clemens). Chem. Control Res. Inst. Rep. CC-X-110.

Morris, P.M., Rosenfeld, A., and Bellinger, M. 1993. What Americans think about agrichemicals. Public Voice for Food and Health Policy, Washington, DC.

Mück, O., Hassan, S., Huger, A.M., and Krieg, A. 1981. The effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the parasitic Hymenopterans *Apanteles glomeratus* L. (Braconidae) and *Pimpla thurionella* (L.) (Ichneumonidae). Z. Angew. Entomol. 92: 303-314.

Mulla, M.S., Federici, B.A., and Darwazeh, H.A. 1982. Larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-11 against stagnant-water mosquitoes and its effects on nontarget organisms. Environ. Entomol. 11:788-795.

Navon, A. 1993. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 125-146.

Nobel, M.A., Riben, P.D., and Cook, G.J. 1992. Microbiological and epidemiological survey programme to monitor the health effects of Foray 48B Btk spray. Departments of Pathology and Health Care and Epidemiology, Univ. British Columbia, and Univ. Hospital, Vancouver.

Operation Ever Green 1997. Environmental impact assessment of aerial spraying Btk in New Zealand. Http://www.goglobal.co.nz/evergreen.

Otvos, I.S. and Vanderveen, S. 1993. Environmental report and current status of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Use for control of forest and agricultural insect pests. British Columbia Forestry Canada Rep.

Petras, S. and Casida, L.E. Jr. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1496-1501.

Pimentel, D., Krummel, J., Gallahan, D., Hough, J., Merrill, A., Schreiner, I., Vittum, P., Koziol, F., Back, E., Yen, D., and Fiance, S. 1978. Benefits and costs of pesticides use in United States food production. BioScience 28:772, 778-784.

Pimentel, D., Andow, D., Dyson-Hudson, R., Gallahan, D., Jacobson, S., Irish, M., Kroop, S., Moss, A., Schreiner, I., Shepard, M., Thompson, T., and Vinzant, B. 1980. Environmental and social costs of pesticides: a preliminary assessment. Oikos 34:127-140.

Pinnock, D.E., Brand, J.R., and Milstead, J.E. 1971. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. J. Invertebr. Pathol. 18: 405-411.

Pruett, C.J.H., Burges, H.D., and Wyborn, C.H. 1980. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 35: 168-174.

Reardon, R.C. and Haissig, K. 1984. Efficacy and persistence of *Bacillus thuringiensis* after ground application to balsam fir and white spruce in Wisconsin. Can. Entomol. 116: 153-158.

Rigby, S. 1991. Bt in crop protection. PJB Publ., Richmond, Surrey, UK.

Rodenhouse, N.L., and Holmes, R.T. 1992. Results of experimental and natural food reductions for breeding black-throated blue warblers. Ecology 73: 357-372.

Rogoff, M.H. 1982. Regulatory safety data requirements for registration of microbial pesticides. In: Microbial and viral pesticides (Edited by E. Kurstak). Marcel Dekker, New York. pp. 645-679.

Saleh, S.M., Harris, R.F., and Allen, O.N. 1970. Fate of *Bacillus thuringiensis* in soil: effect of soil pH and organic amendment. Can. J. Microbiol. 16: 677-680.

Samples, J.R., and Buettner, H. 1983. Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). Am. J. Ophthalmol. 95: 258-260.

Siegel, J.P., Shadduck, J.A., and Szabo, J. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. J. Econ. Entomol. 80: 717-723.

Siegel, J.P., and Shadduck, J.A. 1990. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals. J. Econ. Entomol. 83: 347-355.

Smith, D., and Lacewell, R.D. 1996. Economic and environmental aspects of crop protection chemicals. Environmental Issue/sustainability Technical Report 96-01 of Agriculture Program, Texas A&M Univ.

Starnes, R.L., Liu, C.L., and Marrone, P.G. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. Am. Entomol. 39(2): 83-91.

Steinhaus, E.A. 1956. Microbial control - the emergence of an idea. Hilgardia 26: 107-160.

Surgeoner, G.A., and Farkas, M.J. 1990. Review of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (BTK) for use in forest pest management programs in Ontario - with special emphasis on the aquatic environment. Report to the Water Resources Branch, Ontario Ministry of the Environment, Toronto.

Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., and Johnson, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.

Tabashnik, B.E. 1992. Resistance risk management: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidopteran: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidopteran: Noctuidae), and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 85: 1551-1559.

Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Entomol. 39: 47-79.

Tabashnik, B.E., and McGaughey, W.H. 1994. Resistance risk assessment for single and multiple insecticides: responses of Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 87: 834-841.

Trevors, J.T., Barkey, T., and Bourquin, A.W. 1987. Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. Can. J. Microbiol., 33, 191-198.

Trumble, J.T., Carson, W.G., and White, K.K. 1994. Economic analysis of a *Bacillus thuringiensis*-based integrated pest management program in fresh-market tomatoes. J. Econ. Entomol. 87(6): 1463-1469.

Trumble, J.T., Carson, W.G., and Kund, G.S. 1997. Economics and environmental impact of a sustainable integrated pest management program in celery. J. Econ. Entomol. 90(1): 139-146.

USDA (United States Department of Agriculture) 1995. Gypsy moth management in the United States: a cooperative approach. Final environmental impact statement. USDA, Forest Service, Northeastern Area State and Private Forestry. Radnor, PA.

Van Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 1-35.

Van Frankenhuyzen, K., Nystrom, C.W., and Tabashnik, B.E. 1995. Variation in tolerance to *Bacillus thuringiensis* among and within populations of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in Ontario. J. Econ. Entomol. 88: 97-105.

Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D., and Van Mellaert, H. 1990. Mechanisms of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 247: 72-74.

Vandenberg, J.D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 83(3): 755-759.

Vandenberg, J.D., and Shimanuki, H. 1986. Two commercial preparations of the ß-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* influence the mortality of caged adult honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Environ. Entomol. 15: 166-169.

Visser, S., Addison, J.A., and Holmes, S.B. 1994. Effects of DiPel® 176, a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*B.t.k.*) formulation, on the soil microflora and the fate of *B.t.k.* in an acid forest soil: a laboratory study. Can. J. For. Res. 24: 462-471.

Wagner, D.L., Peacock, J.W., Carter, J.L., and Talley, S.E. 1996. Field assessment of *Bacillus thuringiensis* on nontarget Lepidoptera. Environ. Entomol. 25(6): 1444-1454.

Warren, R.E., Rubenstein, D., Ellar, D.J., Kramer, J.M., and Gilbert, R.J. 1984. *Bacillus thuringiensis* in soil by immunofluorescence. J. Invertebr. Pathol. 43: 150-155.

Weber, W.C. 1993. Potential effect of gypsy moth spraying on songbirds in south coastal British Columbia. BC Ministry of Agriculture, Fisheries & food. In Information Submitted to BC Environmental Appeal Beard, March 1993 by Agriculture Canada. pp. 238-246.

Whalon, M.E., and McGaughey, W.H. 1993. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *In*: Advanced engineered pesticides (Edited by L. Kim). Marcel Dekker, New York. pp. 215-232.

Agriculture et Agroalimentaire Canada
Direction générale de la recherche

Agriculture and Agri-Food Canada
Research Branch

Canada

Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*

Bulletin technique no. 29

Centre de Recherche et de Développement en Horticulture

Site web : http://res2.agr.ca/stjean/crdh.htm

Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*

Bulletin technique no. 29

Kwang-Bo Joung, M. Sc.
Centre de R&D en horticulture
Programme de doctorat en Sciences de l'environnement
Université du Québec à Montréal, Qc
Canada

Jean-Charles Côté, Ph. D.
Chercheur en microbiologie
Centre de R&D en horticulture
Direction générale de la recherche
Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc
Canada

Copies disponibles au :
Site web du Centre de R&D en horticulture
http://res2.agr.ca/stjean/crdh.htm
sous la rubrique Publications

No. de catal. A54-9/29
ISSN 0825-4559
ISBN 0-662-65398-X

© TPSGC 2000

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ 2

INTRODUCTION 2
1. Avantages de la lutte microbienne contre les insectes ravageurs 2
2. Les débuts de la lutte microbienne contre les insectes ravageurs 2
3. Qu'est-ce que le *Bacillus thuringiensis* (Bt) 3
   3.1. Les δ-endotoxines du Bt et leur mode d'action 3
   3.2. Utilisation commerciale des produits à base de Bt 3

CHAPITRE I. INCIDENCES ÉCOLOGIQUES 4
1. Devenir du Bt dans l'environnement 4
   1.1. Sur le feuillage 4
   1.2. Dans le sol 4
   1.3. Dans l'eau 4
2. Effets du Bt dans le sol 5
3. Effets du Bt dans l'eau 5
4. Effets du Bt sur les plantes 5
5. Effets du Bt sur les invertébrés non ciblés 5
   5.1. Microorganismes du sol 5
   5.2. Lépidoptères non ciblés 5
   5.3. Abeille domestique 6
   5.4. Autres invertébrés 6
   5.5. Invertébrés aquatiques 6
6. Effets du Bt sur les vertébrés 7
   6.1. Poissons 7
   6.2. Amphibiens et reptiles 7
   6.3. Oiseaux 7
   6.4. Mammifères 7
7. Effets du Bt sur les humains 8
8. Apparition de la résistance au Bt 9

CHAPITRE II. INCIDENCES ÉCONOMIQUES 10

CHAPITRE III. INCIDENCES SOCIO-CULTURELLES 11
1. Réactions des consommateurs 11
2. Réactions du public aux pulvérisations 11

CONCLUSION et PERSPECTIVES D'AVENIR 12
Tableau 1. Formulations commerciales de *Bacillus thuringiensis* 12
Tableau 2. Données de toxicité du *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* 13

RÉFÉRENCES 14

RÉSUMÉ

L'utilisation d'insecticides chimiques contre les insectes ravageurs a permis d'accroître considérablement la productivité des secteurs agricole et forestier. Toutefois, les inquiétudes croissantes de la population à l'égard des effets potentiellement néfastes des insecticides chimiques pour l'environnement ont amené la communauté scientifique à chercher des solutions de rechange à la lutte chimique. À lui seul, le *Bacillus thuringiensis* (Bt) accapare aujourd'hui 95% du marché mondial des agents microbiens de lutte contre les ravageurs.

Le présent document examine d'un point de vue écologique, économique et social les incidences environnementales de l'utilisation des formulations commerciales courantes de Bt à titre d'agents microbiens de lutte contre les insectes ravageurs. Les incidences écologiques, ou effets biotiques et abiotiques, sont l'objet du chapitre I. Les retombées économiques potentielles directes et indirectes sont passées en revue au chapitre II. Les incidences socio-culturelles, c'est-à-dire les réactions des consommateurs à l'utilisation des pesticides en agriculture et celles de la population aux programmes de pulvérisation de Bt, sont décrites au chapitre III.

INTRODUCTION

L'introduction du DDT en 1945 et la prolifération subséquente des insecticides chimiques de synthèse ont joué un rôle déterminant dans l'accroissement de la productivité agricole, la protection des cultures et des forêts et la lutte contre les insectes vecteurs de maladies humaines. L'utilisation massive d'insecticides chimiques comporte cependant de nombreux inconvénients. Parmi les principaux, mentionnons la contamination de l'eau et des sources de nourriture, l'intoxication d'espèces animales et végétales non ciblées, la concentration dans les chaînes trophiques et la sélection de populations d'insectes ravageurs résistantes aux insecticides chimiques. Les inquiétudes croissantes du public à l'égard des effets potentiellement néfastes de l'utilisation massive d'insecticides chimiques pour l'environnement ont amené la communauté scientifique à chercher des solutions de rechange à la lutte chimique. Parmi les solutions qui ont été proposées, l'utilisation de microorganismes entomopathogènes comme le *Bacillus thuringiensis* (Bt) apparaît comme particulièrement prometteuse.

Un des facteurs qui limite l'introduction de nombreux microorganismes entomopathogènes prometteurs sur le terrain est notre relative méconnaissance de l'écologie, du devenir et des effets de ces organismes dans l'environnement. Avant d'envisager un lâcher dans l'environnement, il est essentiel de choisir un mode d'application approprié et de bien connaître la persistance du microorganisme sélectionné dans l'environnement, son potentiel reproductif (multiplication), la rapidité avec laquelle ses gènes peuvent être transférés aux organismes indigènes, son potentiel de dispersion hors des sites d'application (dissémination) et ses effets sur l'équilibre et le fonctionnement des écosystèmes exposés (sécurité, avantages et dommages) (Trevors *et al.*, 1987).

L'innocuité du Bt dans l'environnement est maintenant bien établie, quelques souches sauvages étant appliquées depuis plus de trente ans sans le moindre incident ou dommage sous forme de formulations commerciales en quantités de plus en plus importantes pour protéger les cultures vivrières, les plantes ornementales, les arbres forestiers et les grains ensilés (Meadows, 1993). En outre, les nombreux projets de recherche fondamentale et appliquée qui ont accompagné l'exploitation et l'étude du Bt nous ont permis d'acquérir des connaissances limitées sur le comportement du microorganisme dans l'environnement.

1. Avantages de la lutte microbienne contre les insectes ravageurs

Un des principaux avantages des agents de lutte microbienne réside dans le fait qu'ils peuvent remplacer, du moins en partie, certains des insecticides chimiques les plus dangereux. À l'heure actuelle, les agents de lutte chimique sont utilisés beaucoup plus couramment à l'échelle mondiale que les agents microbiens. Comme il n'est pas certain que tous les pesticides représentent une menace pour l'environnement, leur remplacement par des agents microbiens n'allégerait pas nécessairement les risques pour l'environnement. Néanmoins, pour ce qui est des nombreux pesticides chimiques dont la toxicité s'étend au-delà des ravageurs ciblés, notamment aux animaux et aux humains, l'accès à des agents de lutte biologique plus sûrs, plus sélectifs et biodégradables comporte d'importants avantages au plan écologique. Un des avantages écologiques des agents microbiens provient de leur grande sélectivité, leur action infectieuse ou létale étant limitée à seulement quelques ravageurs ciblés.

2. Les débuts de la lutte microbienne contre les insectes ravageurs

L'étude des maladies des insectes, des acariens et des autres invertébrés, objet de la pathologie des invertébrés, fournit les fondements scientifiques de la lutte microbienne. La pathologie des invertébrés puise ses origines dans l'étude des maladies touchant certains organismes utiles comme le ver à soie et l'abeille domestique. Les maladies du ver à soie ont été étudiées pour la première fois en Chine dès 2700 av. J.-C., tandis que celles des abeilles l'ont été par Aristote en 355 av. J.-C. Ce sont cependant les

travaux de Bassi qui, en 1834, ont permis pour la première fois d'associer un microorganisme, en l'occurrence le champignon *Beauveria bassiana*, à l'apparition d'une maladie chez un animal, le ver à soie. Trente années plus tard, Louis Pasteur entreprenait d'étudier de façon rigoureuse les diverses maladies du ver à soie. Ces deux pionniers du XIX^{e} siècle estimaient que les microorganismes pourraient être utilisés à profit pour lutter contre les insectes nuisibles (Steinhaus, 1956).

Bien que de nombreux progrès aient été accomplis dans le domaine de la pathologie des invertébrés entre la fin du XXI^{e} siècle et la première moitié du XX^{e} siècle, ce n'est qu'à partir de la découverte, de la mise au point et, subséquemment, de la production commerciale du *Bacillus thuringiensis* Berliner que la lutte microbienne a pris son véritable essor (Lacey et Goettel, 1995). À ce jour, même si plus d'une centaine d'espèces bactériennes sont reconnues comme entomopathogènes, seules quelques espèces de *Bacillus*, en particulier le Bt, ont été commercialisées avec succès (Starnes *et al.*, 1993).

3. Qu'est-ce que le *Bacillus thuringiensis*

Le Bt est un bacille à Gram positif, aérobie et sporulé qui est étroitement apparenté à la bactérie *Bacillus cereus*; il est présent dans pratiquement tous les sols. Les cellules végétatives mesurent 1 µm de largeur sur 5 µm de longueur et sont pourvues de courts flagelles ciliés. Le Bt est une bactérie ubiquiste qui se rencontre dans le sol, l'eau, l'air et sur le feuillage. Il se distingue du *B. cereus* par sa capacité de produire une protéine cristallisée durant la sporulation (Höfte et Whiteley, 1989; Martin, 1994).

Le Bt a été isolé pour la première fois en 1901 par le bactériologiste japonais S. Ishiwata à partir de vers à soie [*Bombyx mori* (L.)] infectés. En 1911, en Allemagne, E. Berliner a rédigé la première description scientifique de la bactérie. En 1916, Aoki et Chigasaki ont montré que l'activité du Bt était due à une toxine présente dans les cultures sporulées, mais absente dans les jeunes cultures de cellules végétatives (Beegle et Yamamoto, 1992).

3.1 Les δ-endotoxines du Bt et leur mode d'action

Le Bt produit un corps d'inclusion parasporal de nature cristalline durant la sporulation. Ce cristal est constitué de protéines. Un grand nombre de protéines cristallisées apparentées ont été identifiées, et un cristal peut renfermer plusieurs types de protéine. Pour dénouer une situation aussi confuse, Höfte et Whiteley (1989) ont proposé un système de classification des protéines cristallisées et des gènes codant leur synthèse. Cette classification repose sur la structure des protéines cristallisées et sur la gamme d'hôtes. Plus de 14 gènes codant la synthèse de protéines cristallisées distinctes ont été décrits, et d'autres protéines présentant des propriétés insecticides ont été identifiées récemment (Lereclus *et al.*, 1993).

Les gènes codent pour la synthèse d'une famille de protéines apparentées présentant des propriétés insecticides (Cry) et sont répartis dans quatre grandes classes, selon que la spécificité des protéines s'exprime à l'endroit des Lépidoptères (I), des Lépidoptères et des Diptères (II), des Coléoptères (III) ou des Diptères (IV). Chaque classe est divisée en un certain nombre de sous-classes possédant des propriétés insecticides et structurales propres. Récemment, un nouveau système de classification fondé uniquement sur l'identité des acides aminés a été proposé (Crickmore *et al.*, 1998). Cette nouvelle classification permet de regrouper les toxines étroitement apparentées et élimine la nécessité de soumettre chaque nouvelle toxine à des essais biologiques contre une série sans cesse croissante d'organismes.

Les protéines cristallisées exercent leurs effets sur l'hôte en lysant les cellules épithéliales de l'intestin moyen et en provoquant la paralysie du tube digestif. L'insecte infecté cesse de se nourrir et finit par mourir s'il ne parvient pas à se rétablir. Une fois ingérés, les cristaux se dissolvent dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'hôte. La protéolyse de la protéine cristallisée solubilisée ou protoxine produit le fragment toxique (toxine). Une fois liée à des récepteurs spécifiques présents sur les membranes des cellules épithéliales de l'intestin moyen, la toxine induit la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales et, ce faisant, provoque la mort des cellules et de la larve infectée (Aronson *et al.*, 1986; Höfte et Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989; Adang, 1991; Gill *et al.*, 1992; Bauer, 1995).

À partir du mode d'action des protéines cristallisées du Bt, on peut supposer qu'au moins quatre paramètres interviennent dans la fonction de la protéine cristallisée : 1) l'efficacité de la solubilisation; 2) l'efficience de la conversion protoxine-toxine; 3) la liaison des récepteurs spécifiques aux membranes; 4) la formation des pores membranaires. Tous ces paramètres déterminent la spécificité d'une protéine de cristal (spectre insecticide).

3.2 Utilisation commerciale des produits à base de Bt

Les premières applications de Bt dans l'environnement ont eu lieu en 1933. Bien que le Bt soit disponible sur le marché depuis 1938, c'est la mise au point de la méthode de fermentation liquide aérobie en cuve profonde qui, en permettant la production de préparations de spores et de cristaux, a rendu possible sa commercialisation à grande échelle au cours des années 1950. Le Bt a été utilisé massivement en Amérique du Nord contre plus de 40 ravageurs dans des champs, des forêts, des vergers, des vignobles, des parcs et des jardins (Burges et Daoust, 1986). Les premières formulations commerciales de Bt ont été mises à l'essai au champ aux États-Unis en 1958 (Faust, 1974). En 1961, la sous-espèce *kurstaki* (Btk) a été utilisée comme biopesticide contre des Lépidoptères nuisibles sensibles. La plupart des insecticides à base de Bt renferment des cristaux de δ-endotoxines et des spores qui amplifient par synergie la toxicité des cristaux. Même si l'efficacité de ces premiers insecticides à base de Bt était souvent imprévisible, les travaux de recherche et de développement visant à améliorer les formulations et les modes de distribution et d'application et à trouver de nouvelles souches plus actives ont progressé lentement. Le marché était dominé par des produits renfermant l'isolat HD-1 de la sous-espèce *kurstaki* utilisés contre diverses espèces de Lépidoptères s'attaquant aux arbres forestiers et aux grandes cultures. Les Lépidoptères sont demeurés à toutes fins utiles les seules cibles du Bt jusqu'au milieu des années 1970.

En 1976, la découverte de la sous-espèce *israelensis*, toxique pour les larves de moustiques et de simulies (Goldberg et Margalit, 1977), et de la sous-espèce *tenebrionis*, toxique pour plusieurs espèces de Coléoptères (Krieg *et al.*, 1983), ont conduit à la naissance de nouveaux marchés. Ces découvertes ont entraîné un gain subit et considérable de l'intérêt commercial pour le Bt (Van Frankenhuyzen,

1993). Selon Lambert et Perferoen (1992), 40 000 souches de Bt sont maintenant conservées à l'échelle mondiale, principalement dans des collections privées.

À l'heure actuelle, la liste des sous-espèces de Bt homologuées inclut *kurstaki, aizawai, israelensis* et *tenebrionis*, dont l'activité insecticide s'exprime de façon prédominante contre les Lépidoptères, les Diptères et les Coléoptères, respectivement (tableau 1). En application topique, le Bt présente une demi-vie brève parce qu'il est rapidement inactivé par les rayons ultraviolets, et de nombreuses recherches ont été consacrées à la mise au point de nouvelles stratégies de distribution. L'utilisation de plantes transgéniques résistantes aux insectes exprimant les gènes responsables de la synthèse des δ-endotoxines constitue de loin la stratégie la plus controversée à l'heure actuelle.

Le présent document est essentiellement consacré aux formulations commerciales pulvérisables de Bt. Par conséquent, les plantes transgéniques qui possèdent les gènes codant la synthèse des δ-endotoxines du Bt ne sont pas considérées dans la présente analyse. En sont également exclues les variétés de Bt produisant des ß-exotoxines. Depuis 1971, l'utilisation de ces dernières variétés contre les insectes ravageurs n'est plus approuvée.

CHAPITRE 1
INCIDENCES ÉCOLOGIQUES

1. Devenir du Bt dans l'environnement

La persistance du Bt dans l'environnement est importante tant du point de vue écologique que commercial. Cette question est examinée par Otvos et Vanderveen (1993).

1.1 Sur le feuillage

La persistance du Bt sur le feuillage dépend de plusieurs facteurs environnementaux. Selon Leong *et al.* (1980), les principaux facteurs responsables de la dégradation de l'endospore sont l'exposition au soleil, la température et le déficit hygrométrique. Le rayonnement solaire, en particulier le rayonnement ultraviolet, inactive 50% des spores en 30 minutes, et cette proportion grimpe à 80% après 60 minutes (Krieg, 1975). L'inactivation des spores et des cristaux est imputée à la production de peroxyde et de radicaux peroxyde après irradiation UV des acides aminés (Ignoffo et Garcia, 1978). En l'absence d'humidité, les spores se dégradent rapidement lorsqu'ils sont exposés au rayonnement solaire, et elles sont donc très vulnérables en présence de conditions très sèches (Pinnock *et al.*, 1971). En général, le Bt perd 50% de son potentiel insecticide en l'espace de 1 à 3 jours, et une deuxième application est donc souvent nécessaire contre certains insectes comme la spongieuse (*Lymantria dispar* Linnaeus), la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clemens), la tordeuse occidentale de l'épinette (*Choristoneura occidentalis* Freeman) et la tordeuse du pin gris (*Choristoneura pinus pinus* Freeman). Certains chercheurs ont cependant fait état d'une activité résiduelle plus longue (10 jours) (McLeod *et al.*, 1983; Beckwith et Stelzer, 1987), et quelques endospores viables de Btk ont été isolées sur du feuillage un an après une application au sol de Btk effectuée à raison de 1 milliard d'unités internationales (MUI)/arbre (Reardon et Haissig, 1984).

1.2 Dans le sol

Le Bt est une bactérie du sol indigène qui est répandue dans le monde entier (Martin et Travers, 1989). La forme végétative du Bt n'est généralement pas bien adaptée au sol, et sa survie dépend de sa capacité d'atteindre l'habitat spécialisé que constituent les insectes vulnérables. Les endospores du Bt peuvent toutefois survivre dans la majorité des types de sol, quoique leur croissance soit inhibée à des valeurs de pH inférieures à 4,8 (Saleh *et al.*, 1970). Des applications répétées de Bt n'entraînent aucune accumulation de la bactérie (Dulmage et Aizawa, 1982). Le devenir du Bt dans le sol dépend vraisemblablement de l'intensité de la compétition avec les autres formes microbiennes. En effet, l'abondance du Bt diminue rapidement dans les sols non stérilisés, tandis qu'elle peut augmenter dans les sols stérilisés (Akiba *et al.*, 1977). Inoculé dans le sol à la dose de 10^5 cellules par gramme de sol, le Bt s'est maintenu à la densité de10^3 cellules par gramme pendant 12 à 16 mois. Toutefois, l'abondance relative du Bt par rapport à celle des autres bacilles du sol a chuté de 20-40% à environ 10%, ce qui indique que le Bt n'est pas bien adapté aux environnements édaphiques. Pruett *et al.* (1980) ont noté qu'après 63 jours, le Bt n'avait conservé que 3% de son activité insecticide dans le sol, même si environ 38% des endospores étaient encore viables. Après 135 jours, 23% des endospores étaient encore viables, mais le Bt avait complètement perdu son activité insecticide.

La dissémination du Bt hors du site d'application est un facteur important qui peut influer sur l'ampleur des effets éventuels de la bactérie. Martin et Reichelderfer (1989) ont étudié la dispersion du Bt à l'aide de souches marquées résistantes aux antibiotiques. Aucun mouvement vertical supérieur à 6 cm n'a été observé dans le sol, et la présence de la bactérie n'a pas été détectée à plus de 10 m hors de la parcelle. N'ayant noté aucune contamination croisée entre deux sérotypes appliqués à proximité l'un de l'autre, Lucca *et al.* (1981) ont également conclu que le Bt ne se déplace pas dans le sol. Aucun signe d'échange génétique n'a été observé, quoique la probabilité qu'un tel échange survienne puisse être limitée dans le sol en présence de conditions favorables à la multiplication du Bt (Meadows, 1993).

1.3 Dans l'eau

Dans le cadre de pulvérisations opérationnelles (4,7-9,4 L/ha de Thuricide 16B) réalisées en Nouvelle-Écosse, Menon et De Mestral (1985) ont détecté la présence du Btk dans des cours d'eau et dans l'eau de réservoir jusqu'à 8 à 12 jours après les traitements. Ces

mêmes auteurs ont également comparé en laboratoire la survie du Btk dans quatre types d'eau : eau distillée et déionisée, eau du robinet, eau de lac et eau de mer. Environ 30% des cellules de Btk étaient encore vivantes 70 jours après avoir été placées dans l'eau distillée et l'eau du robinet; dans l'eau de lac, ce pourcentage grimpait à près de 50%. En revanche, dans l'eau salée, 90% des cellules de Btk étaient déjà mortes après 30 jours, et moins de 10% étaient encore vivantes après 40 jours. Les chercheurs expliquaient la survie prolongée du Btk dans l'eau de lac par la présence de concentrations plus élevées d'éléments nutritifs.

2. Effets du Bt dans le sol

Il semble peu probable que le Bt puisse influer sur la productivité et la fertilité des sols, car la bactérie est normalement présente dans les sols, ne s'y accumule pas et présente une persistance relativement brève (USDA, 1995).

3. Effets du Bt dans l'eau

Le Bt peut entrer en contact avec un plan d'eau (cours d'eau, lacs et océans) s'il est appliqué directement à la surface de l'eau ou s'il y est entraîné par ruissellement ou dans des excréments d'animaux ayant ingéré du Bt. Le Bt ne devrait avoir aucun effet direct sur la qualité de l'eau, et il est inoffensif pour la plupart des organismes aquatiques. Le ralentissement de la décomposition des détritus observé en laboratoire en présence de fortes doses de Btk risque peu de se produire en milieu naturel, les doses normalement appliquées étant plus faibles et les processus naturels jouant un rôle important dans l'épuration de l'eau des écosystèmes (Kreutzweiser *et al.*, 1993). En Nouvelle-Écosse, la présence du Btk a été détectée dans le système municipal d'approvisionnement en eau durant une campagne de pulvérisation de la bactérie. Les doses utilisées pour la chloration de l'eau étaient donc trop faibles pour tuer le Btk (Menon et De Mestral, 1985). Dès lors, les épandages aériens présentent un risque de faible contamination des systèmes d'approvisionnement en eau par le Bt dans les régions contenant des bassins de retenue ou des réservoirs d'eau. Il peut également y avoir contamination si des gouttelettes pénètrent par les évents des réservoirs locaux de distribution d'eau potable. Toutefois, la présence du Bt dans l'eau est considérée comme sans risque pour la santé humaine, car la bactérie n'est pas pathogène pour les humains. Malgré cela, la présence de la bactérie dans les systèmes d'approvisionnement en eau constitue une source de préoccupation pour certaines personnes.

4. Effets du Bt sur les plantes

Aux doses normalement appliquées, le Bt n'a jamais causé d'effets phytotoxiques (effets néfastes pour les plantes) (USDA, 1995). La toxicité du Bt s'exprime seulement si la bactérie est ingérée par un organisme et exposée aux enzymes digestives appropriées en présence d'un pH de 9,0 à 10,5 (Falcon, 1971). Dès lors, les plantes (terrestres et aquatiques) ne sont pas incommodées par le Bt, car elles n'ont pas les structures nécessaires pour ingérer la bactérie et dégrader les cristaux ou les δ-endotoxines.

Chez les plantes dont la pollinisation est assurée exclusivement ou principalement par les Lépidoptères, l'épandage de Bt peut occasionner une diminution temporaire du nombre de graines qui se forment. Toutefois, ce risque est faible, car même les plantes dont la pollinisation est assurée uniquement par les Lépidoptères peuvent être pollinisées par des espèces qui n'avaient pas encore atteint un stade sensible de leur développement au moment de la pulvérisation (Operation Ever Green, 1997).

Comme les chenilles exposées au Bt cessent de se nourrir rapidement après avoir ingéré un cristal, l'application de Bt permet de réduire les dommages causés aux arbres. Si les arbres n'ont pas à produire un nouveau feuillage pour remplacer celui qui a été dévoré par les chenilles, ils peuvent affecter une plus grande proportion des produits de la photosynthèse à leur croissance et à leur reproduction, et non pas à la production d'un nouveau feuillage. En conséquence, l'utilisation du Bt est bénéfique pour les arbres.

5. Effets du Bt sur les invertébrés non ciblés

Les organismes non ciblés peuvent être exposés au Bt soit directement, par ingestion de feuilles contaminées ou au contact de la litière ou de la couche superficielle de sol, soit indirectement, par ingestion de chenilles infectées par la bactérie. Bien que le Bt présente une demi-vie de 12 à 32 heures, son activité insecticide persiste une semaine, parfois davantage (USDA, 1995). En conséquence, seule la génération de chenilles présente au moment de la pulvérisation devrait être affectée par le Bt.

5.1 Microorganismes du sol

Peu de chercheurs ont étudié les effets du Bt sur la microflore du sol, et les résultats des quelques études qui ont été réalisées sont contradictoires (Addison, 1993). Ainsi, Pruett *et al.* (1980) ont noté une augmentation des populations de microorganismes du sol 2 à 4 semaines après avoir utilisé une formulation de Bt renfermant la sous-espèce *galleriae*. Petras et Casida (1985) ont enregistré des tendances similaires avec le Btk. En revanche, Atlavinyté *et al.* (1982) ont observé une réduction des populations de bactéries et d'actinomycètes et une augmentation des effectifs de champignons après avoir ajouté la sous-espèce *galleriae* à la formulation utilisée. Pour sa part, Krieg (1993), cité par Visser *et al.* (1994), n'a relevé aucun effet significatif du Btk parmi les bactéries du sol indigènes. Se fondant sur les résultats de traitements expérimentaux au DiPel® 176 réalisés dans des microcosmes simples, Visser *et al.* (1994) ont conclu qu'il était peu probable que le Bt puisse avoir des effets importants sur la microflore non ciblée en présence de conditions naturelles.

5.2 Lépidoptères non ciblés

Des études en laboratoire ont montré que le Bt est actif contre de nombreux Microlépidoptères et Macrolépidoptères (Krieg et Langenbruch, 1981; Navon, 1993). Peu de chercheurs se sont cependant attachés à documenter les effets du Bt sur les communautés de Lépidoptères indigènes dans leur milieu naturel. Morris *et al.* (1975) ont noté une réduction de 70% des effectifs du lépidoptère défoliateur *Dioryctria reniculelloides* Mutura & Munroe à la suite d'épandages de Bt dirigés contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clemens). En Oregon, Miller (1990) a observé une réduction de la richesse et de la diversité des Lépidoptères indigènes associés au chêne de Garry (*Quercus garryana* Dougl.) après trois applications aériennes de Bt. Johnson *et al.* (1995) ont constaté que les premiers stades larvaires d'espèces de porte-queue du genre *Papilio* demeuraient sensibles au feuillage traité au Bt jusqu'à 30 jours après les applications. Récemment, Wagner *et al.* (1996) ont observé des tendances similaires et ont conclu que bien que le Bt ait des effets transparents chez la plupart des

Lépidoptères, une seule application de Bt au printemps à la dose de 90 MUI/ha n'éliminait pas tous les Lépidoptères exposés. Miller (1990) a observé une baisse importante de la richesse spécifique des Lépidoptères larvaires dans les zones traitées au cours de l'année du traitement et de l'année suivante, mais pas au cours de la deuxième année suivant le traitement. Cet auteur considérait l'âge des chenilles (stade larvaire) au moment des traitements, le nombre de générations par année et le potentiel de dispersion des insectes comme les principaux facteurs influant sur la capacité de rétablissement des espèces non ciblées. Il apparaît peu probable que l'application de Bt puisse provoquer des changements permanents parmi les populations de Lépidoptères non ciblées, sauf dans les habitats abritant de petites populations d'espèces très sensibles au Bt. Ce risque s'accentue considérablement dans les régions où des obstacles physiques ou biologiques empêchent les populations affectées de se retirer des secteurs traités (USDA, 1995).

5.3 Abeille domestique

De nombreuses études ont été consacrées aux effets du Bt sur l'abeille domestique (Cantwell *et al.*, 1972; Davidson *et al.*, 1977; Lehnert et Cantwell, 1978; Vandenberg et Shimanuki, 1986; Vandenberg, 1990). Aucun effet néfaste n'a été signalé parmi les colonies d'abeilles à la suite de traitements foliaires au Bt ou de l'exposition des abeilles à la bactérie en présence de conditions naturelles ou simulées. Appliquée à de très fortes concentrations (10^8 spores/mL de sirop de sucrose), la sous-espèce *tenebrionis*, normalement utilisée contre certaines espèces de Coléoptères comme le doryphore de la pomme de terre [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)], a réduit la longévité des abeilles domestiques adultes, mais elle n'a pas provoqué l'apparition de maladies (Vandenberg, 1990).

5.4 Autres invertébrés

Addison (1993) a dit craindre que certains invertébrés du sol (ex. nématodes, carabes) soient affectés. Toutes les souches de Bt mises à l'essai se sont révélées toxiques pour les œufs du nématode *Trichostrongylus colubriformis*. Les populations d'autres espèces de nématodes ont par contre augmenté à la suite de l'application de Bt au champ. Les applications de Bt ont provoqué une réduction des populations d'un acarien prédateur étroitement associé à des espèces édaphiques (Addison, 1993).

Dans le cadre d'une étude visant à apprécier les effets du Bt sur d'autres organismes du sol, Benz et Altweg (1975) ont noté que certaines espèces de vers de terre n'étaient aucunement affectées par le Btk (Dipel) appliqué sur le sol de peuplements de frêne et d'érable à la dose de 6 000 mg/m², soit une dose 100 fois plus élevée que la dose recommandée (Benz et Altweg, 1975).

Les invertébrés parasites et prédateurs qui se nourrissent d'insectes infectés par le Bt peuvent présenter des chutes de populations temporaires. Toutefois, cette diminution résulte de la disparition de la source de nourriture, et non pas de la toxicité du Bt. Giroux *et al.* (1994a, b) n'ont observé en laboratoire aucun effet direct chez des adultes et des stades larvaires du *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coccinellidés) exposés à une formulation commerciale renfermant la sous-espèce *san diego* (M-One™). Pour leur part, Flexner *et al.* (1986) ont noté en laboratoire que le Bitoxibacillin®, l'Entobakterin® et l'Exotoxin® avaient une action létale directe chez la coccinelle *Coccinella septempunctata* Linnaeus; les autres formulations de Bt (ex. Dipel® et Thuricide®) évaluées contre le *C. septempunctata* et d'autres espèces de coccinelles ont eu peu d'effets, sinon aucun. Muck *et al.* (1981) ont observé une mortalité directe chez des parasitoïdes, en l'occurrence le *Pimpla turionellae* Linnaeus (Ichneumonidés) et le *Cotesia glomeratus* Linnaeus (Braconidés), exposés à une formulation de Btk (Dipel®). L'administration par voie orale de fortes doses (ex. 10^8 et 10^9 spores/mL) a provoqué une hausse significative de la mortalité chez le *C. glomeratus* après deux semaines. Le *P. turionellae* a été moins gravement affecté que le *C. glomeratus*. Toutefois, les doses de Bt normalement utilisées au champ sont plus faibles que la plupart de celles qui ont induit une forte mortalité chez ces parasitoïdes adultes durant cette expérience en laboratoire. Le risque que des parasitoïdes adultes ingèrent une dose létale de Bt en cherchant des hôtes et en se nourrissant de nectar dans des champs traités au Bt pourrait donc être très faible.

Dans le cadre d'essais de la sous-espèce *israelensis* (Bti) qui se sont poursuivis sur une période de trois ans en laboratoire et sur le terrain, Merritt et Wipfli (1994) n'ont observé aucun effet adverse chez divers prédateurs invertébrés (Plécoptères, Odonates, Mégaloptères, Trichoptères, Diptères). Un sommaire des tests d'innocuité du Bti pour divers vertébrés et invertébrés non ciblés compilé par la société Biochem Products (Anonyme, non daté) a révélé qu'à part la mortalité observée chez quelques espèces de mouches et moucherons, aucun effet néfaste n'a été détecté chez près de 100 invertébrés non ciblés différents. Garcia *et al.* (1980) ont obtenu des résultats similaires.

5.5 Invertébrés aquatiques

Après avoir évalué la toxicité de la sous-espèce *kurstaki* (Btk) (Thuricide® 32) pour divers insectes aquatiques, Eidt (1985) a conclu que les pulvérisations de Btk effectuées aux doses recommandées contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette ne représentaient aucun danger pour les organismes servant de nourriture aux poissons dans les cours d'eau exposés. Dans le cadre d'un programme de surveillance d'un cours d'eau dans le parc Algonquin (Ontario), Buckner *et al.* (1974) ont constaté que le Btk n'avait aucun effet mesurable chez les Tricoptères (phryganes), les Éphéméroptères (éphémères), les Plécoptères (perles), les Odonates (libellules et demoiselles), les Coléoptères (aquatiques), les Diptères (mouches), les Turbellariés (planaires, vers plats), les Nématodes (nématodes, vers ronds), les Oligochètes (vers de terre), les Hirudinés (sangsues), les Amphipodes (crustacés), les Décapodes (écrevisses), les Hydracariens (acariens aquatiques), les Gastéropodes (colimaçons) et les Pélécypodes (myes, moules). Otvos and Vanderveen (1993) ont également passé en revue les effets du Btk sur les invertébrés aquatiques. Ils ont conclu que le Btk ne compromet ni l'abondance ni la composition des communautés d'insectes benthiques.

La sous-espèce *israelensis* (Bti) est très toxique pour les larves de certains Diptères (moustiques et simulies) lorsqu'elle est ingérée. Au cours des années qui ont précédé l'utilisation à grande échelle du Bti contre les moustiques (comme dans la vallée du haut Rhin, au cours des années 1980), de nombreuses évaluations de l'innocuité de la bactérie pour les organismes aquatiques non ciblés ont été réalisées. Aucun des taxons exposés dans l'eau à de fortes concentrations de Bti n'a semblé incommodé (Merritt, 1989; Becker et Margalit, 1993). Chez les Diptères, la toxicité du Bti est limitée à quelques familles de Nématocères. Outre les moustiques et les simulies, seuls les Dixidés, famille étroitement apparentée, est sensible au Bti. Les larves de

Psychodidés, de Chironomidés, de Sciaridés et de Tipulidés sont en général beaucoup moins sensibles. D'autres Diptères, comme la mouche domestique (*Musca domestica* Linnaeus, Muscidés) et les Syrphidés, come le *Helophilus pendulus* Linnaeus, sont insensibles au Bti (Ali, 1981; Mulla *et al.*, 1982; Back *et al.*, 1985; Becker et Margalit, 1993). En Nouvelle-Écosse, dans le cadre d'un essai d'une préparation de Bti (Vectobac® 1200L), aucune différence significative n'a été relevée entre l'abondance avant et après le traitement des populations de Chironomidés et de Simuliidés vivant dans les cours d'eau exposés à la bactérie (McCracken et Matthews, 1997).

Merritt et Wipfli (1991) ont évalué les effets indirects des traitements au Bti chez le *Nigronia serricornis* Say et l'*Acroneuria lycorias* Newman, deux prédateurs de simulies, et le *Prostoia completa* Walker, un détritivore. Même s'ils ne les affectent pas directement, les traitements au Bti comportent des répercussions secondaires pour les organismes non ciblés, y compris les prédateurs et les détritivores. Comme ces insectes sont des généralistes, ils ne risquent pas trop de souffrir de l'élimination des populations larvaires de simulies s'ils peuvent trouver d'autres sources de nourriture appropriées.

6. Effets sur les vertébrés

Les effets des formulations de Bt sur la santé des animaux incluent les effets directs engendrés par l'exposition au Bt ainsi que les effets indirects résultant de l'ingestion d'insectes infectés par le Bt. L'exposition aux insecticides à base de Bt peut résulter de l'ingestion du Bt déposé sur le feuillage ou d'insectes infectés par le Bt, de l'inhalation de gouttelettes de Bt ou de l'exposition cutanée. Toutefois, compte tenu du mode d'action du Bt, ni l'exposition cutanée ni l'inhalation de la bactérie ne présentent de risque pour les animaux (USDA, 1995).

L'USDA (1995) présente en un tableau les résultats de diverses évaluations en laboratoire de la toxicité du Btk pour les poissons, les oiseaux et les mammifères (Tableau 2).

Les changements de structure de la chaîne trophique provoqués par les applications de Bt peuvent imposer un stress environnemental à certains animaux essentiellement insectivores.

6.1 Poissons

Aucune mortalité n'a été observée chez les poissons à la suite des nombreuses campagnes de pulvérisation de Bt menées en milieux forestiers, agricoles et urbains au cours des vingt dernières années au Canada et aux États-Unis (USDA, 1995). Passant en revue les résultats de plusieurs évaluations de la toxicité du Bt pour les poissons, Forsberg *et al.* (1976) font état de plusieurs études effectuées avec d'anciennes formulations de Bt et fournissent dans chaque cas des valeurs de toxicité. Il est cependant impossible de savoir si ces formulations contenaient ou non des ß-exotoxines, car la présence de ces toxines n'était pas mentionnée à l'époque. En conséquence, il convient de faire preuve de prudence dans l'interprétation des valeurs de toxicité établies dans le cadre de ces études. Pour le Thuricide, dont on sait qu'il renfermait à l'époque des ß-exotoxines, aucun cas de mortalité n'a été signalé à des doses égales ou inférieures à 600 ppm. Comme cette formulation contenait des ß-exotoxines, aujourd'hui considérées comme toxiques pour les vertébrés, les valeurs indiquées représentent des seuils de toxicité significativement supérieurs à ceux des formulations de Bt utilisées de nos jours, lesquelles sont exemptes de ces toxines.

La possibilité que le Bt ait également des effets toxiques indirects pour les poissons, notamment en cas d'ingestion de cadavres d'insectes infectés par le Bt, doit également être prise en compte (Forsberg *et al.*, 1976). Toutefois, rien n'indique que la consommation d'insectes infectés par le Bt puisse incommoder de façon perceptible les poissons (Surgeoner et Farkas, 1990).

6.2 Amphibiens et reptiles

Aucune mention d'effets néfastes directs pour les amphibiens ou les reptiles n'a été trouvée dans la littérature. Ces animaux se nourrissent de diverses espèces d'insectes et de petits invertébrés, mais les Lépidoptères ne forment qu'une faible proportion de leur régime alimentaire. La plupart des amphibiens et reptiles risquent donc peu d'être incommodés par le Bt (USDA, 1995).

6.3 Oiseaux

Buckner *et al.* (1974) indiquent n'avoir observé aucune baisse significative des populations d'oiseaux (74 espèces réparties dans 21 familles) dans des parcelles traitées au Bt aménagées dans des peuplements d'épinette et de sapin, au Manitoba et en Ontario. Selon Weber (1993), le risque de mortalité due au Bt est négligeable chez les oiseaux adultes, et les effets potentiels les plus graves du Bt pourraient se traduire par une diminution localisée du succès de la reproduction chez les quelques espèces dont la survie est le plus étroitement liée à l'abondance des Lépidoptères comme source de nourriture.

Plusieurs chercheurs ont étudié sur le terrain les effets de la réduction des sources de nourriture engendrée par le Bt chez les oiseaux insectivores, en particulier les migrateurs néotropicaux (Rodenhouse et Holmes, 1992; Gaddis, 1987; Gaddis et Corkran, 1986). Rodenhouse et Holmes (1992) ont noté chez la paruline bleue (*Dendroica caerulescens*), un migrateur néotropical, une réduction significative du nombre de tentatives de nidification par oiseau par année et du nombre de chenilles ingérées dans les parcelles traitées. Ils n'ont cependant observé aucune différence significative dans le nombre de jeunes produits par territoire, par saison et par couple, et ce en dépit du fait que le nombre de tentatives de nidification ait été moindre dans les parcelles traitées. Pour ce qui est de l'abondance des chenilles, aucune différence n'a été relevée entre les secteurs traités et les secteurs témoins deux ans après le traitement. Gaddis (1987) et Gaddis et Corkran (1986) ont étudié le succès de la reproduction et l'alimentation de la mésange à dos marron et de la mésange à tête noire près de Portland, en Orégon. Ils n'ont relevé aucune différence entre les sites traités et les sites témoins pour ce qui est du succès de la reproduction et de divers indicateurs de la croissance des jeunes au cours de la première année. Au cours de la deuxième année, ils ont cependant noté une réduction significative du nombre de jeunes ayant atteint le stade d'envol dans les secteurs traités. Bien que les chenilles formaient au cours des deux années une plus faible proportion de la nourriture rapportée au nid dans les parcelles traitées, la quantité globale de nourriture rapportée était la même dans les deux types de parcelles. En conséquence, la relation entre l'application de Bt et les taux d'échec de la nidification était incertaine. Le United States Department of Agriculture (USDA) qualifiait de subtils les effets du Bt sur les oiseaux insectivores révélés par ces études sur le terrain (USDA, 1995).

6.4 Mammifères

Certaines des premières évaluations de l'innocuité du Bt pour les mammifères étaient compliquées par la présence de ß-exotoxines

dans les préparations utilisées. L'utilisation de souches produisant des ß-exotoxines est interdite aux États-Unis depuis 1971 (Ignoffo, 1973). De nombreux auteurs ont fait état du risque d'effets toxiques ou pathogènes posés par les produits à base de Bt, précisant cependant que ces agents entomopathogènes étaient pratiquement sans danger pour les mammifères s'ils n'étaient pas appliquées à des doses très élevées.

D'après les lignes directrices de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) applicables à l'évaluation de l'innocuité des agents bactériens (Anonyme, 1981), les agents de lutte bactérienne doivent être soumis non seulement à des épreuves de toxicité par voies orale, intrapéritonéale, respiratoire et cutanée et à des épreuves d'allergénécité et d'hypersensibilité, mais aussi à des épreuves d'exposition oculaire (chez le lapin) et de mutagénécité *in vitro*. Le Bt a passé tous ces tests avec succès, de même que des épreuves d'exposition sous-cutanée et des épreuves d'exposition par ajout au régime alimentaire d'une durée de trois semaines. Rogoff (1982) présente une historique des évaluations réglementaires de l'innocuité du Bt qui ont été réalisées conformément aux exigences de l'Environmental Protection Agency (EPA).

Dans le cadre d'une étude de terrain réalisée au Canada, Buckner *et al.* (1974) ont noté que les petits mammifères (souris sauteuse des bois, souris sylvestre, grande musaraigne, musaraigne commune, campagnol à dos roux, tamia rayé) ont continué de se reproduire durant toute la durée des traitements. Les données de piégeage ont également indiqué que les traitements au Bt n'avaient pas altéré la structure de la communauté de petits mammifères vivant dans les secteurs traités.

Utilisant des préparations commerciales (Abbott Laboratories, North Chicago, Ill.), Siegel *et al.* (1987, 1990) ont établi l'innocuité des formulations de Bti pour le rat, la souris et le lapin. Ils n'ont observé aucun signe d'infection par le Bt ni chez le rat, ni chez la souris, le nombre de cellules souches unipotentes (CFU) diminuant dans le temps au lieu d'augmenter. La prévention de l'infection ne reposait pas sur l'intégrité du système immunitaire, puisque les quantités de Bti récupérées chez des souris euthymiques traitées aux corticostéroïdes et des souris thymoprives diminuaient dans le temps. Selon ces auteurs, le Bti est non virulent et non envahissant chez les mammifères et peut être utilisé sans danger dans des environnements où l'exposition humaine est prévisible.

Bien que la sous-espèce *tenebrionis* soit très toxique pour le doryphore de la pomme de terre, des épreuves de toxicité aiguë ont démontré qu'elle est non toxique pour les mammifères (Mycogen Corporation, épreuves toxicologiques de catégorie 1).

7. Effets sur les humains

Très peu d'expériences avec le Bt ont été réalisées chez les humains (Otvos et Vanderveen, 1993). Dans une étude, 18 sujets ont ingéré quotidiennement pendant cinq jours un gramme d'une formulation encapsulée de Bt de la sous-espèce *thuringiensis*. Cinq sujets ont également inhalé quotidiennement pendant cinq jours 100 mg d'une formulation en poudre de Bt. Aucun effet défavorable n'a été observé au cours des examens physiques, des analyses de laboratoire ou des examens radiologiques (Fisher et Rosner, 1959). Les doses administrées dans le cadre de cette expérience s'élevaient à plus de 10^7 spores de Btk/kg (inhalation) et à plus de 10^{10} spores de Btk/kg (voie orale). Ces doses sont considérablement plus élevées que celles auxquelles la population risque d'être exposée durant un programme d'épandage aérien.

La littérature médicale ne mentionne qu'un seul cas d'effet nocif imputable au Bt chez les humains. Le sujet, un agriculteur de 18 ans jusque-là sans antécédents médicaux, a reçu des éclaboussures d'une formulation commerciale (Dipel®) dans un œil. Il est alors traité à l'aide d'un onguent antibiotique. Trois jours plus tard, son œil étant encore irrité, le médecin lui prescrit un onguent à base de corticostéroïdes. Dix jours après l'accident, une ulcération de la cornée est diagnostiquée et traitée avec succès à l'aide d'injections sous-conjonctivales de gentamicine et de sodium de céfazoline. Le Bt isolé à partir de l'ulcération de la cornée est mis en culture. L'ulcération se résorbe deux semaines après le début du traitement topique à la gentamicine (Samples et Buettner, 1983). Ces auteurs tenaient le Bt responsable de l'ulcération, mais ils n'ont pas envisagé la possibilité que la lésion ait été causée par d'autres facteurs et que le Btk y ait uniquement séjourné.

Dans le cas du Bti, Warren *et al.* ont mentionné le cas d'un étudiant diplômé qui s'est infecté après s'être injecté accidentellement une préparation contenant du Bti et *l'Actinobacter calcoaceticus* dans un doigt. Un traitement antibiotique a permis de réprimer complètement l'infection en quelques jours.

Deux études épidémiologiques approfondies ont été consacrées à l'exposition de la population au Btk au Canada et aux États-Unis. Chez la population, les voies d'exposition les plus probables sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Chez les travailleurs, l'exposition par voie parentérale ou oculaire est également possible. En fait, une vaste enquête menée auprès de travailleurs affectés au programme de pulvérisation dans la grande zone urbaine de Vancouver a révélé que certains de ceux qui avaient pris part à la campagne de pulvérisation de Btk au sol sans porter de vêtements protecteurs avaient éprouvé de légères irritations de la peau, des yeux et des voies respiratoires. Ces effets étaient en général transitoires et de nature irritative : assèchement de la peau, lèvres gercées, irritations, rougeurs et brûlures oculaires, écoulements et congestion nasales. Durant l'essai, ces symptômes étaient deux à trois fois plus fréquents parmi les travailleurs affectés aux traitements au sol que parmi le groupe témoin. Toutefois, ces travailleurs avaient vraisemblablement été exposés à des doses beaucoup plus importantes que les travailleurs affectés aux traitements aériens ou la population. Dans les faits, ces doses étaient environ 500 fois plus élevées que celles auxquelles aurait été exposée un observateur se trouvant à l'extérieur au moment du traitement. En conséquence, le risque que les travailleurs affectés aux traitements aériens ou la population ressentent de tels effets après avoir été exposés au Btk est beaucoup plus faible (Nobel *et al.*, 1992). Cette étude a également révélé que le Btk peut persister jusqu'à quatre semaines (ou plus longtemps chez une minorité de sujets) dans les cavités nasales des travailleurs. Aucun problème de santé grave imputable à une exposition au Btk n'a été signalé chez les travailleurs, et aucune perte de jours de travail n'a pu être attribuée au Btk. Une étude américaine (Green *et al.*, 1990) a révélé que les travailleurs affectés aux traitements au sol présentaient de faibles niveau d'exposition cumulée au Btk durant la durée des traitements et que les travailleurs participant aux traitements aériens montraient des niveaux d'exposition à peine supérieurs à ceux enregistrés parmi l'ensemble de la population (USDA, 1995). Les autorités américaines devaient

d'ailleurs conclure, à la lumière des résultats des enquêtes épidémiologiques disponibles et en considération des nombreuses années d'utilisation, que l'exposition au Btk ne présentait aucun danger pour la population (USDA, 1995).

8. Évolution de la résistance

L'efficacité non démentie des insecticides à base de Bt pendant de nombreuses années, plus précisément jusqu'au milieu des années 1980, et l'absence de toute résistance à ces produits ont grandement contribué à établir un climat d'incrédulité face à l'idée qu'une résistance au Bt puisse survenir un jour (Burges, 1971; Krieg et Langenbruch, 1981; Boman, 1981). On croyait que les effets multiples sur les espèces hôtes et les avantages évolutifs de l'agent pathogène empêchaient ou réduisaient fortement le risque que des insectes puissent acquérir une résistance envers la bactérie. Cependant, comme on a pu le constater au cours de la dernière décennie, l'apparition d'une résistance aux δ-endotoxines peut être rapide chez de nombreux insectes ravageurs, tant en laboratoire que sur le terrain (McGaughey, 1985; McGaughey et Beeman, 1988). Tabashnik *et al.* (1990) ont présenté le premier cas bien documenté de résistance au Btk sur le terrain. Précédemment, d'autres auteurs avaient cependant déjà évoqué la possibilité d'une résistance chez des populations du *Plutella xylostella*, aux Philippines (Kirsch et Schmutterer, 1988). Des souches significativement plus résistantes au Bti ont été découvertes chez les moustiques *Culex quinquefaciatus* Say et *Aedes aegypti* Linnaeus (Georghiou *et al.*, 1983; Goldman *et al.*, 1986). Au moins une souche du doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata* Say) a été sélectionnée pour sa résistance à une souche de Bt de la sous-espèce *tenebrionis*, active contre les Coléoptères (Miller et al., 1990).

De nombreuses études de populations d'insectes sélectionnées pour leur résistance au Bt en laboratoire ont clairement mis en évidence la capacité génétique des populations d'acquérir une résistance aux δ-endotoxines du Bt (Van Rie *et al.*, 1990; McGaughey et Whalon, 1992; Whalon et McGaughey, 1993; Tabashnik, 1992, 1994; Tabashnik et McGaughey, 1994; Estada et Ferré, 1994; McGaughey et Johnson, 1994; Van Frankenhuyzen *et al.*, 1995). Ces études ont démontré que : 1) les allèles codant pour la résistance au Bt sont présents à divers degrés chez différentes espèces et populations d'insectes; 2) chez une espèce donnée, la génétique, les mécanismes, le degré et la stabilité de la résistance varient d'une population à l'autre; 3) la sélection avec un mélange de toxines permet de sélectionner pour une résistance à chaque toxine du mélange; 4) l'apparition de la résistance se produit plus rapidement avec des toxines purifiées qu'avec des préparations de spores et de cristaux; 5) la résistance croisée aux δ-endotoxines est presque toujours ubiquiste et souvent imprévisible; 6) la re-sélection des populations révertantes est rapide (Bauer, 1995).

À l'heure actuelle, la majorité des stratégies proposées pour gérer ou prévenir l'apparition d'une résistance semblent reposer sur l'hypothèse selon laquelle le nombre de toxines disponibles dans la nature est pratiquement illimité et que l'utilisation de ces toxines dans divers mélanges et régimes de culture (en mosaïque, rotations ou séquentiels) permet de vaincre la résistance (Tabashnik, 1994). Les stratégies de lutte intégrée optimisant la gestion de la résistance comportent les objectifs suivants : 1) diversifier les sources de mortalité de manière à éviter la sélection d'un seul mécanisme; 2) réduire la pression sélective pour le principal facteur de mortalité; 3) maintenir un bassin d'insectes sensibles en aménageant des refuges et en favorisant l'immigration; 4) surveiller étroitement toute augmentation de la résistance à l'égard d'un facteur de mortalité donné; 5) réagir à l'apparition d'une résistance en appliquant des stratégies de lutte permettant de réduire la fréquence du caractère de résistance (Whalon et McGaughey, 1993).

CHAPITRE II
INCIDENCES ÉCONOMIQUES

Pour être en mesure de tirer le meilleur profit des pesticides tout en réduisant au maximum les risques posés par leur utilisation, les agriculteurs et les consommateurs ont besoin d'informations justes sur les avantages des divers plans d'utilisation des pesticides. Ces informations peuvent leur être fournies sous deux formes : 1) des preuves démontrant que les programmes commerciaux conventionnels permettent d'optimaliser les rendements tout en réduisant le plus possible les utilisations non nécessaires; 2) des données économiques claires sur l'avantage d'utiliser d'autres programmes prévoyant l'utilisation de pesticides peu toxiques pour les mammifères et bien acceptés par les organismes de réglementation et le grand public.

Il a été démontré qu'investir dans la lutte contre les ravageurs à l'aide de pesticides est avantageux au plan économique à bien des égards. Le coût des pesticides peut représenter entre 4 et 11% de la valeur marchande brute d'une culture. Selon certaines estimations, l'élimination des insecticides chimiques entraînerait une diminution de la production agricole de 15%, la conversion des terres à rendement marginal en cultures en lignes et une hausse annuelle du coût du panier d'épicerie par ménage de 228$ (Smith et Lacewell, 1996). Pour chaque dollar investi dans l'achat de pesticides, les agriculteurs profiteraient d'un retour direct de 3 à 5$ (Headley, 1968; Pimentel *et al.*, 1978). Toutefois, ces chiffres ne reflètent pas les coûts indirects de l'utilisation de pesticides chimiques comme les intoxications humaines dues aux pesticides, la réduction des populations de poissons et des autres espèces sauvages, la perte de bétail, la destruction des plantes cultivées et sauvages sensibles, la perte de ruchers, l'élimination des ennemis naturels et l'apparition d'une résistance aux pesticides et de divers problèmes causés par les ravageurs secondaires (Pimentel *et al.*, 1980).

Il a été démontré que les formulations de Bt sont sans danger pour l'environnement ainsi que pour les humains, comme on l'a vu au chapitre précédent. En outre, le coût de développement de ces formulations de Bt est largement inférieur à celui des pesticides chimiques conventionnels. Les sommes investies à ce jour dans la mise au point de nouvelles formulations contenant des organismes entomopathogènes représentent moins de 1% du montant consacré au développement des pesticides chimiques. Le pourcentage de nouvelles souches de Bt produisant des cristaux aux propriétés insecticides parmi les souches évaluées est largement supérieure (1 pour 1 000) à la proportion de pesticides chimiques homologués par rapport aux composés testés (1 pour 20 000) (Lambert et Perferoen, 1992).

Trumble *et al.* (1997) ont comparé dans des plantations de céleri, en 1992 et en 1993 (plantations expérimentales) et en 1995 (plantations commerciales), les avantages respectifs d'une pratique culturale classique reposant sur l'utilisation de pesticides chimiques standards et d'un programme de lutte intégrée privilégiant le recours au Bt. En 1992 et en 1993, les profits nets enregistrés avec le Bt étaient supérieurs de 1 485$/ha et de 614$/ha, respectivement, à ceux réalisés avec les traitements chimiques standards. Dans les plantations commerciales, en 1995, le profit net réalisé avec le Bt était de 410$/ha supérieur à celui obtenu avec les traitement chimiques. En comparaison des quantités normalement utilisées par la majorité des producteurs de céleri, l'utilisation de Bt a également permis de réduire d'environ 40% les quantités de pesticides utilisées. Des résultats similaires ont été obtenus dans des champs de tomates destinées au marché des légumes frais. Les profits réalisés avec le Bt dépassaient de 500 à 1 000$/ha ceux obtenus avec le traitement chimique standard.

Au début des années 1990, Rigby (1991) évaluait à environ 100M $ le marché mondial des insecticides biologiques à base de Bt (Amérique du Nord, 57,2M $; Extrême-Orient, 24M $; Moyen-Orient/Afrique, 12,9M $; Amérique centrale et Amérique du Sud, 8,1M $; Australasie, 2,1M $; Europe de l'Ouest, 0,7M $). Ces chiffres n'incluent pas la part de ce marché dans l'ancienne Union soviétique et en Europe de l'Est. À l'heure actuelle, un large éventail de produits standards à base de Bt peuvent être utilisés contre les insectes ravageurs, et la popularité de ces produits ne cesse de croître. En 1996 et en 1997, les revenus liés à la vente de formulations à base de Bt enregistrés par la société Mycogen Corp. se sont élevés à respectivement 45,9 et 40,5M $. En 1997, la valeur du marché européen des biopesticides était estimée à 102M $, et l'on prévoyait qu'elle atteindrait 167,2M $ en 2004 (Anonyme, 1997). À l'heure actuelle, le marché des insecticides à l'échelle planétaire est évalué à 8 milliards de dollars annuellement, et tout porte à croire que la part du marché des insecticides biologiques atteindra presque 500M $ en 2000 (Georgis, 1996).

CHAPITRE III
INCIDENCES SOCIO-CULTURELLES

1. Réactions des consommateurs

Si les consommateurs peuvent se procurer des aliments à un prix abordable, c'est en grande partie en raison de l'efficience de la production agricole. Toutefois, ils s'attendent également à ce que ces aliments soient sans danger, et ils s'inquiètent de plus en plus de la présence de résidus dans leurs aliments, de la pureté de l'eau qu'ils boivent et de la pérennité biologique globale de leur environnement. De nombreux intervenants ont fait état de leurs préoccupations à l'égard de ces questions et d'autres encore, comme en font foi le contenu et l'esprit d'une loi récente adoptée par le Congrès américain. Lors d'un sondage récent réalisé aux États-Unis (Morris *et al.*, 1993), 91% des répondants ont exprimé leur inquiétude à l'égard des grandes quantités de pesticides et de produits chimiques utilisées pour la production des denrées alimentaires, et 95% ont dit craindre que des pesticides ou des engrais finissent par contaminer leur approvisionnement en eau. Neuf consommateurs sur dix estiment que les agriculteurs américains doivent adopter des stratégies de production exigeant moins de produits chimiques, favorisant l'application de méthodes naturelles et préconisant l'utilisation de produits chimiques uniquement en dernier recours. La plupart des consommateurs ont affirmé être disposés à payer un peu plus cher pour des aliments produits avec moins de pesticides chimiques, et 79% ont déclaré espérer trouver dans leur supermarché plus de produits cultivés selon des techniques exigeant moins de substances chimiques.

L'industrie alimentaire utilise couramment le Bt pour lutter contre les insectes ravageurs. À Vancouver, dans le cadre d'un programme opérationnel de pulvérisation (Foray 48B, Btk), des chercheurs ont analysé des échantillons d'aliments afin d'en déterminer la teneur en Btk. Ils ont réussi à établir des cultures de Btk à partir de divers légumes durant et après la campagne de pulvérisation. Ces auteurs doutaient fortement que tout le Btk trouvé sur les légumes ait été issu du programme de pulvérisation aérienne (Noble *et al.*, 1992). En outre, les effets sur la santé humaine des résidus de Bt dans les aliments semblent négligeables, car le Bt est incapable de se multiplier dans les animaux à sang chaud et traverse l'appareil digestif sans causer le moindre effet toxique. En raison de ces caractéristiques et de leur non toxicité pour l'environnement, les formulations à base de Bt constituent une des principales composantes des programmes de lutte intégrée.

Une étude récente (Anderson *et al.*, 1996) a révélé que dans une forte proportion (85%), les consommateurs sont prêts à acheter des denrées produites selon une approche de lutte intégrée et sont favorables à l'idée de restreindre l'utilisation des pesticides chimiques si cela permet de protéger la santé humaine et la qualité de leur environnement.

2. Réactions des consommateurs aux pulvérisations

Les personnes qui vivent à proximité d'arbres ou de fermes risquent d'être exposées au Bt. Celles qui travaillent en forêt ou dans des endroits où il y a des arbres, qui mélangent ou appliquent des insecticides ou manipulent des formulations commerciales de Bt en laboratoire sont plus susceptibles d'être exposées fréquemment à des produits commerciaux à base de Bt. Les perceptions des gens concernant les traitements antiparasitaires au Bt et leurs comportements à l'égard de cette question peuvent varier selon l'endroit où ils vivent. Les personnes qui vivent en banlieue ou en milieu rural sont plus susceptibles de rencontrer des insectes nuisibles et de s'en trouver alarmées. En général, les traitements antiparasitaires inquiètent moins les personnes qui vivent dans des régions agricoles rurales, car ils font partie de leur quotidien. Un sondage d'opinion réalisé aux États-Unis dans le cadre d'une évaluation des incidences environnementales de la lutte contre la spongieuse (USDA, 1995) a révélé que la présence des hélicoptères et des aéronefs utilisés pour l'application des insecticides inquiétait et effrayait la population. Certaines personnes étaient fortement préoccupées par l'innocuité des insecticides et n'avaient pas confiance aux mesures de lutte contre les insectes prises par le gouvernement. D'autres s'inquiétaient des risques potentiels engendrés par les projets de pulvérisation, en particulier des déversements accidentels de pesticides, des accidents d'avion ou d'automobile, de l'exposition des travailleurs aux insecticides, de l'engorgement de la circulation automobile, des bris de lignes de transport d'électricité, du comportement agressif des chiens et de l'altération des conditions ambiantes et de l'état des boisés. Enfin, les auteurs de ce rapport insistaient sur l'importance de mettre en œuvre des programmes de communication et d'éducation et d'émettre des avis durant les campagnes de pulvérisation afin d'apaiser les craintes de la population.

CONCLUSION et PERSPECTIVES D'AVENIR

L'utilisation du Bt comporte de nombreux avantages. En effet, son activité larvicide est rapide et sa durée de conservation est longue, sa production exige des milieux de culture relativement peu dispendieux, son application s'effectue à l'aide d'équipements standards, et ses effets sur les insectes bénéfiques et les autres organismes non ciblés sont nuls à négligeables. De nombreuses études font état de l'utilisation fructueuse du Bt pour la protection des cultures et des forêts. Les occasions d'utiliser le Bt conjointement à d'autres agents de lutte biologique et à diverses pratiques culturales et pesticides courants se sont accrues considérablement avec la découverte de nouvelles toxines comportant un spectre d'activité plus large, l'introduction de formulations plus efficaces et l'amélioration des procédés d'application. En réalité, le Bt est devenu la pierre angulaire de plusieurs programmes de lutte intégrée, notamment dans les secteurs agricoles où la présence de résidus de pesticides dans les aliments constitue une source de préoccupation majeure.

Plusieurs facteurs pourraient favoriser une plus grande utilisation du Bt dans le futur, en particulier l'augmentation des coûts sociaux résultant de l'utilisation massive des pesticides chimiques et l'escalade rapide des coûts directs du développement et de la production des nouveaux insecticides chimiques. De toute évidence, la recherche de nouvelles souches de Bt et de traitements encore plus efficaces continuera de mobiliser l'attention des chercheurs. Les programmes de sélection en cours conduiront à la découverte de souches plus toxiques et présentant de nouveaux spectres d'activité. La découverte de nouvelles souches produisant des combinaisons de toxines insecticides plus puissantes et la mise au point de nouvelles combinaisons de toxines à l'aide de méthodes de recombinaison de l'ADN contribueront également à accroître la popularité du Bt. Ainsi, plusieurs fabricants de formulations à base de Bt (ex. Ecogen, Mycogen et PGS) possèdent de vastes collections comptant jusqu'à plusieurs milliers d'isolats de Bt. De nombreux nouveaux types de cristaux toxiques pour les acariens, les chrysomèles des racines du maïs (*Diabrotrica* spp.), les nématodes, les diptères adultes et les fourmis ont été isolés. Bon nombre de ces souches demeurent à caractériser, mais leur utilisation dans un avenir rapproché s'annonce prometteuse.

Tableau 1. Formulations commerciales de *Bacillus thuringiensis*.

Sous-espèce	Fabricant	Produit
kurstaki	Abbott Laboratories	Boibit, DiPel, Foray
	Bactec Corp.	Bactec Bernan
	Becker Microbial Products, Inc.	BMP 123
	Ecogen Inc.	Condor, Crymax, Cutlass, Raven
	Forward International Ltd.	Forwabit
	Thermo Trilogy	Costar, Javelin, Thuricide, Vault
	Sanex Inc.	Bactosid K
	Tecomag	Agrobac
	Troy Biosciences Inc.	Troy-BT
	Mycogen Corp.	MVP, MVP II, M-Peril
israelensis	Abbott Laboratories	Bactimos, Gnatrol, Skeetal, VectoBac
	Becker Microbial Products, Inc.	Aquabac, Aquabac Primary Powder
	Sanex Inc.	Vectocide
tenebrionis	Abbott Laboratories	Novodor
	Mycogen Corp.	M-track
aizawai	Abbott Laboratories	Xen Tari
	Thermo Trilogy	Agree, Design
	Mycogen Corp.	Mattch
morrisoni	Bactec Corp.	Bactec Bernan

(Adapté de *Farm Chemicals Handbook*, 1997)

Tableau 2. Données de toxicité du Bacillus *thuringiensis* ssp. *kurstaki*

Espèce	Voie d'administration, toxicité, dose	Effet
Mammifères		
Humain	Orale, aiguë, trois jours consécutifs	Aucun effet/aucune infectiosité
Rat	Orale, aiguë	$DL_{50} \geq 4{,}7 \times 10^{11}$ spores/kg
Rat	Orale, aiguë	$DL_{50} \geq 2{,}67$ g/kg
Souris	Orale, aiguë, 10 000 mg/kg	Aucun effet
Lapin	Orale, aiguë	$DL_{50} \geq 2{,}0 \times 10^{9}$ spores/animal
Chien	Orale, aiguë, 10 000 mg/kg	Aucun effet
Lapin	Cutanée, aiguë (Dipel 6AF®)	$DL_{50} \geq 2\,000$ mg/kg
Rat	Inoculation, aiguë	$DL_{50} \geq 3{,}4 \times 10^{11}$ spores/kg
Lapin	Inoculation, aiguë	$DL_{50} \geq 6{,}9 \times 10^{7}$ spores/kg
Rat	Inoculation, aiguë	$DL_{50} \geq 8 \times 10^{11}$ spores/animal
Mouton	Orale, une dose de Dipel D® ou de Thuricide-HP® (environ 10^{12} spores par jour) pendant 5 mois	Aucun effet toxique ni aucun effet significatif lié au traitement (physique ou clinique)
Oiseaux		
Oiseaux	Orale, aiguë	DL_{50} = 178 ppm, CSEO = 1 ppm
Colin de Virginie	Orale, aiguë	DL_{50} > 10 000 mg/kg
Canard colvert	Orale, aiguë	DL_{50} > 2 000 mg/kg
Poissons		
Truite arc-en-ciel	Exposition de 96 heures	CSEO > 1 000 ppm
Truite arc-en-ciel	Exposition de 96 heures	CL_{50} > 10 mg/L
Crapet arlequin	Exposition de 96 heures	CL_{50} > 95 mg/L
Truite arc-en-ciel, crapet arlequin, *Cyprinodon variegatus* Anguille	30 jours à 100 fois la concentration environnementale prévue aux doses recommandées pour le Dipel 2 000 fois la concentration environnementale prévue aux doses recommandées pour le Dipel	Aucun effet néfaste

(Adapté de USDA, 1995)

RÉFÉRENCES

Adang, M.J. 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action, and utilization. In: Biotechnology for biological control of pests and vectors (Edited by K. Maramorosch). CRC Press, London. pp: 3-23.

Addison, J.A. 1993. Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: A review. Can. J. For. Res. 23: 2329-2342.

Akiba, Y., Sikijima, Y., Atzawa, K., and Fujiyoshi, N. 1977. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis* II. Dynamics of *B. thuringiensis* in sterilized soil (English summary). Japanese J. Appl. Entomol. Zool. 21: 41-46.

Ali, A. 1981. *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (ABG-6180) against chironomids and some non-target aquatic invertebrates. J. Invertebr. Pathol. 38: 264-272.

Anderson, M.D., Hollingsworth, C.S., Van Zee, V., Coli, W.M., and Rhodes, M. 1996. Consumer response to integrated pest management and certification. Agri. Ecosys. Environm. 60: 97-106.

Anonymous undated. Bactimos™ for mosquito and black fly control, technical information. Biochem Products, Salisbury Laboratories, Inc. P.O. Box 264, 100 Rockland Road, Montchanin, DE 19710.

Anonymous 1981. Mammalian safety of microbial agents for vector control: a WHO memorandum. Bull. W.H.O. 59: 857-863.

Anonymous 1997. European biopesticide market will grow by 64% in next seven years. Intern. Pest Control 39(6): 180.

Aronson A.I., Beckman, W., and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50: 1-24.

Atlavinyté, O., Galvelis, A., Daciulyte, J., and Lugauskas, A. 1982. Effects of entobacterin on earthworm activity. Pedobiologia 23: 372-379.

Back, C., Boisvert, J., Lacoursière, J.O., and Charpentier, G. 1985. High-dosage treatment of a Quebec stream with *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*: efficacy against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non-target insects. Can. Entomol. 117: 1523-1534.

Bauer, L.S. 1995. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Florida Entomol. 78(3): 414-442.

Becker, N., and Margalit, J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 147-170.

Beckwith, R.C., and Stelzer, M.J. 1987. Persistence of *Bacillus thuringiensis* in two formulations applied by helicopter against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in north central Oregon. J. Econ. Entomol. 80: 204-207.

Beegle, C.C., and Yamamoto, T. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. Can. Entomol. 124: 587-616.

Benz, G., and Altweg, A. 1975. Safety of *Bacillus thuringiensis* for earthworms. J. Invertebr. Pathol. 26: 125-126.

Boman, H.G. 1981. Insect responses to microbial infection. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980 (Edited by H.D. Burges). Academic Press, New York. pp. 769-784.

Buckner, C.H., Kingsbury, P.D., McLeod, B.B., Mortensen, K.L., and Ray, D.G.H. 1974. Evaluation of commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* with and without chitinase against spruce budworm. F. Impact of aerial treatment on non-target organisms. Chemical Control Research Institute, Info. Rep. CC-X-59. Canadian Forestry Service, Ottawa.

Burges, H.D. 1971. Possibilities for pest resistance to microbial control agents. In: Microbial control of insects and mites (Edited by H.D. Burges and N.W. Hussey). Academic Press, New York. pp. 445-457.

Burges, H.D., and Daoust, R.A. 1986. Current status of the use of bacteria as biocontrol agents. In: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology (Edited by R.A. Samson, J.M. Vlak and D. Peters). Soc. Invertebr. Pathol., Wageningen. pp. 514-517.

Cantwell, G.E., Lehnert, T., and Fowler, J. 1972. Are biological insecticides harmful to the honey bee? Am. Bee J. 112(7): 255-258.

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

Davidson, E.W., Morton, H.L., Moffett, J.O., and Singer, S. 1977. Effect of *Bacillus thuringiensis* strain SSII-1 on honey bees, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 29: 344-346.

DeLucca, A.J.II, Simonson, J.G., and Larson, A.D. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of United States. Can. J. Microbiol. 27: 865-870.

Dulmage, H.T., and Aizawa, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In: Microvial and viral pesticides (Edited by E. Kurstak). Marcel Dekker, New York. pp. 209-237.

Eidt, D.C. 1985. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to aquatic insects. Can. Entomol. 117:829-837.

Estada, U., and Ferré, J. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3840-3846.

Falcon, L.A. 1971. Use of bacteria for microbial control of insects. In: Microbial control of insects and mites (Edited by B.D. Burges and N.W. Hessey). Academic Press, New York. pp. 67-95.

Faust, R.M. 1974. Bacterial diseases. In: Insect Diseases (Edited by G.E. Cantwell). Marcel Dekker, New York. pp. 87-183.

Fisher, R., and Rosner, L. 1959. Toxicology of the microbial insecticide, Thuricide. Agri. Food Chem. 7: 686-688.

Flexner, J.L., Lighthart, B., and Croft, B.A. 1986. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. Agri. Ecosys. Environ. 16: 203-254.

Forsberg, C.W., Henderson, M., Henry, E., and Roberts, J.R. 1976. *Bacillus thuringiensis*: its effects on environmental quality. Natl. Res. Coun. Can. Publ. No. NRCC 15385, Ottawa.

Gaddis, P.K. 1987. Secondary effects of BT spray on avian predators: the reproductive success of chickadees-1987. Oregon Department of Agriculture, Plant Division Report, Salem.

Gaddis, P.K., and Corkran, C.C. 1986. Secondary effects of BT spray on avian predators: the reproductive success of chestnut-backed chickadees. Oregon Department of Agriculture, Plant Division Report 86-03, Salem.

Garcia, R., DesRochers, B., and Tozer, W. 1980. Studies on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against organisms found in association with mosquito larvae. Proc. Ann. Conf. Of the Calif. Mosquito and Vector Control Assoc. pp. 33-36.

Georghiou, G.P., Barker, J., Al-Khatib, Z., Mellon, R., Murray, C., Tran, H., Vasquez, M., Pelsue, F., and Hazelrigg, J. 1983. Insecticide resistance in mosquitoes: research on new chemical and techniques for management. In: Mosquito control research annual report. University of California, Riverside, pp. 86-91.

Georgis, R. 1996. Present and future prospects of biological insecticides. Conference on biological control. April, Cornell University. Http://www.nysaes.cornell.edu

Gill, S.S., Cowles, E.A., and Pietrantonio, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins. Ann. Rev. Entomol. 37: 615-636.

Giroux, S., Coderre, D., Vincent, C., and Côté J.-C. 1994a. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on predation effectiveness, development and mortality of *Coleomegilla maculata lengi* (Col.: Coccinellidae) larvae. Entomophaga 39(1): 61-69.

Giroux, S., Côté J.-C., Vincent, C., Martel, P., and Coderre, D. 1994b. Bacteriological insecticide M-One effects on predation efficiency and mortality of adult *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae). J. Econ. Entomol. 87: 39-43.

Goldberg, L.J., and Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles serengetii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti* and *Culex pipiens.* Mosq. News 37: 355-358.

Goldman, I.F., Arnold, J., and Carlton, B.C. 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecis *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquitoe *Aedes aegypti.* J. Invertebr. Pathol. 47: 317-324.

Green, M., Heumann, M., Sokolow, R., Foster, L.R., Bryant, R., and Skeels, M. 1990. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-1986. Am. J. Public Health 80: 848-852.

Headley, J.C. 1968. Estimating the production of agricultural pesticides. Am. J. Agri. Econ. 50: 13-23.

Höfte, H., and Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis.* Microbiol. Rev., 53: 242-255.

Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. Ann. N. Y. Acad. Sci. 27: 141-164.

Ignoffo, C.M., and Garcia, C. 1978. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. Environ. Entomol. 7: 270-272.

Johnson, K.S., Scriber, J.M., Nitao, J.K., and Smitly, D.R. 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to three nontarget Lepidoptera in field studies. Environ. Entomol. 24: 288-297.

Kirsch, K., and Schmutterer, H. 1988. Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in the Philippines. J. Appl. Entomol. 105: 249-255.

Kreutzweiser, D.P., Capell, S.S., Thomas, D.R., and Wainio-Keizer, K.L. 1993. Effects of Btk on aquatic microbial activity, detrital decomposition, and invertebrate communities. NAPIAP Proj. NA-25. Sault Ste. Marie, Ontario: Forestry Canada, Forest Pest Management Institute.

Krieg, A. 1975. Photoprotection against inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet rays. J. Invertebr. Pathol. 25: 267-268.

Krieg, A. 1983. Bekämpfung von Insekten im pflanzenschutz mit *Bacillus thuringiensis*—Präparaten und deren einfluss auf die umwelt. 2. Mitteilung. Anz. Schaedlingskd. Pflanzenschutz Umweltschutz 56: 41-52.

Krieg, A., and Langenbruch, G.A. 1981. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis.* In: Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980 (Edited by H.D. Burges). Academic Press, New York. pp 837-896.

Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A., and Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer gegenuber larven von Coleopteren wirksamer. Pathotyp. Z. Ang. Entomol. 96: 500-508.

Lacey, L.A., and Goettel, M.S. 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. Entomophaga 40(1): 3-27.

Lambert, B., and Peferoen, M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis.* Bioscience 42: 112-122.

Lehnert, T., and Cantwell, G.E. 1978. The effects of microbial pesticides on the honey bee - A review. Am. Bee J. 118(10): 674-675.

Leong, K.L.H., Cano, R.J., and Kubinski, A.M. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. Environ. Entomol. 9(5): 593-599.

Lereclus, D., Bougouin, C., Lecadet, M.M., Klier, A., and Rapoport, G. 1989. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis.* In: Regulation of Procaryotic Development (Edited by I. Smith, R.A. Slepecky and P. Setlow). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp: 255-276.

Lereclus, D., Delécluse, A., and Lecadet, M.-M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *Bacillus thuringiensis,* an Environmental Biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 37-69.

Marrone, P.G. 1994. Present and future use of *Bacillus thuringiensis* in integrated pest management systems: an industrial perspective. Biocon. Sci. Technol. 4(4): 517-526.

Martin, P.A.W. 1994. An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. Am. Entomol. 40(1): 85-90.

Martin, P.A.W., and Traverse, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55(10): 2437-2442.

Martin, W.F., and Reichelderfer, C.F. 1989. *Bacillus thuringiensis*: persistence and movement in field crops. In: Proceedings and Abstracts; Society for Invertebrate Pathology XXIIⁿᵈ Annual Meeting, Univ. Maryland, USA. 20-24 August, 1989. p. 25.

McCracken, I.R., and Matthews, S.L. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* applications on invertebrates from two streams on Prince Edward Island. Environ. Contamin. Toxicol. 58: 291-298.

McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis.* Science 229: 193-195.

McGaughey, W.H., and Beeman, R.W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 81: 28-33.

McGaughey, W.H., and Whalon, M.E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science 258: 1451-1455.

McGaughey, W.H. and Johnson, D.E. 1994. Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross-resistance in Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 87: 535-540.

McLeod, P.J., Yearian, W.C., and Young, S.Y. 1983. Persistence of *Bacillus thuringiensis* on second year lobolly pine cones. Environ. Entomol. 12: 1190-1192.

Meadows, M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 193-220.

Menon, A.S., and De Mestral, J. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in waters. Water, Air, and Soil Pollution 25: 265-274.

Merritt, R.W. 1989. A broad evaluation of B.t.i. for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget effects on invertebrates and fish. J. Am. Mosq. Contr. Ass. 5(3): 397-415.

Merritt, R.W., and Wipfli, M.S. 1991. Changes in feeding habits of selected nontarget aquatic insects in response to live and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac-killed black fly larvae (Diptera: Simuliidae). Can. Entomol. 123: 179-185.

Merritt, R.W., and Wipfli, M. 1994. Impact of Bti on non-target aquatic insects and trout. Http://www.msue.msu.edu/msue/imp/modet/61893002.html

Miller, J. C. 1990. Field assessment of the effects of a microbial pest control agent on non-target Lepidoptera. Am. Entomol. 36: 135-139.

Miller, D.L., Rahardja, U., and Whalon, M.E. 1990. Development of a strain of Colorado potato beetle resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. Pest Resistance Manage. 2(2): 25.

Morris, O.N., Armstrong, J.A., and Hildebrand, M.J. 1975. Laboratory tests and field trials of low volume aerial applications of *Bacillus thuringiensis*-Orthene combinations against spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clemens). Chem. Control Res. Inst. Rep. CC-X-110.

Morris, P.M., Rosenfeld, A., and Bellinger, M. 1993. What Americans think about agrichemicals. Public Voice for Food and Health Policy, Washington, DC.

Mück, O., Hassan, S., Huger, A.M., and Krieg, A. 1981. The effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the parasitic Hymenopterans *Apanteles glomeratus* L. (Braconidae) and *Pimpla thurionella* (L.) (Ichneumonidae). Z. Angew. Entomol. 92: 303-314.

Mulla, M.S., Federici, B.A., and Darwazeh, H.A. 1982. Larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-11 against stagnant-water mosquitoes and its effects on nontarget organisms. Environ. Entomol. 11:788-795.

Navon, A. 1993. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 125-146.

Nobel, M.A., Riben, P.D., and Cook, G.J. 1992. Microbiological and epidemiological survey programme to monitor the health effects of Foray 48B Btk spray. Departments of Pathology and Health Care and Epidemiology, Univ. British Columbia, and Univ. Hospital, Vancouver.

Operation Ever Green 1997. Environmental impact assessment of aerial spraying Btk in New Zealand. Http://www.goglobal.co.nz/evergreen.

Otvos, I.S. and Vanderveen, S. 1993. Environmental report and current status of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Use for control of forest and agricultural insect pests. British Columbia Forestry Canada Rep.

Petras, S. and Casida, L.E. Jr. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1496-1501.

Pimentel, D., Krummel, J., Gallahan, D., Hough, J., Merrill, A., Schreiner, I., Vittum, P., Koziol, F., Back, E., Yen, D., and Fiance, S. 1978. Benefits and costs of pesticides use in United States food production. BioScience 28:772, 778-784.

Pimentel, D., Andow, D., Dyson-Hudson, R., Gallahan, D., Jacobson, S., Irish, M., Kroop, S., Moss, A., Schreiner, I., Shepard, M., Thompson, T., and Vinzant, B. 1980. Environmental and social costs of pesticides: a preliminary assessment. Oikos 34:127-140.

Pinnock, D.E., Brand, J.R., and Milstead, J.E. 1971. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. J. Invertebr. Pathol. 18: 405-411.

Pruett, C.J.H., Burges, H.D., and Wyborn, C.H. 1980. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 35: 168-174.

Reardon, R.C. and Haissig, K. 1984. Efficacy and persistence of *Bacillus thuringiensis* after ground application to balsam fir and white spruce in Wisconsin. Can. Entomol. 116: 153-158.

Rigby, S. 1991. Bt in crop protection. PJB Publ., Richmond, Surrey, UK.

Rodenhouse, N.L., and Holmes, R.T. 1992. Results of experimental and natural food reductions for breeding black-throated blue warblers. Ecology 73: 357-372.

Rogoff, M.H. 1982. Regulatory safety data requirements for registration of microbial pesticides. In: Microbial and viral pesticides (Edited by E. Kurstak). Marcel Dekker, New York. pp. 645-679.

Saleh, S.M., Harris, R.F., and Allen, O.N. 1970. Fate of *Bacillus thuringiensis* in soil: effect of soil pH and organic amendment. Can. J. Microbiol. 16: 677-680.

Samples, J.R., and Buettner, H. 1983. Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). Am. J. Ophthalmol. 95: 258-260.

Siegel, J.P., Shadduck, J.A., and Szabo, J. 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. J. Econ. Entomol. 80: 717-723.

Siegel, J.P., and Shadduck, J.A. 1990. Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals. J. Econ. Entomol. 83: 347-355.

Smith, D., and Lacewell, R.D. 1996. Economic and environmental aspects of crop protection chemicals. Environmental Issue/sustainability Technical Report 96-01 of Agriculture Program, Texas A&M Univ.

Starnes, R.L., Liu, C.L., and Marrone, P.G. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. Am. Entomol. 39(2): 83-91.

Steinhaus, E.A. 1956. Microbial control - the emergence of an idea. Hilgardia 26: 107-160.

Surgeoner, G.A., and Farkas, M.J. 1990. Review of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (BTK) for use in forest pest management programs in Ontario - with special emphasis on the aquatic environment. Report to the Water Resources Branch, Ontario Ministry of the Environment, Toronto.

Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., and Johnson, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.

Tabashnik, B.E. 1992. Resistance risk management: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidopteran: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidopteran: Noctuidae), and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 85: 1551-1559.

Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Entomol. 39: 47-79.

Tabashnik, B.E., and McGaughey, W.H. 1994. Resistance risk assessment for single and multiple insecticides: responses of Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 87: 834-841.

Trevors, J.T., Barkey, T., and Bourquin, A.W. 1987. Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. Can. J. Microbiol., 33, 191-198.

Trumble, J.T., Carson, W.G., and White, K.K. 1994. Economic analysis of a *Bacillus thuringiensis*-based integrated pest management program in fresh-market tomatoes. J. Econ. Entomol. 87(6): 1463-1469.

Trumble, J.T., Carson, W.G., and Kund, G.S. 1997. Economics and environmental impact of a sustainable integrated pest management program in celery. J. Econ. Entomol. 90(1): 139-146.

USDA (United States Department of Agriculture) 1995. Gypsy moth management in the United States: a cooperative approach. Final environmental impact statement. USDA, Forest Service, Northeastern Area State and Private Forestry. Radnor, PA.

Van Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 1-35.

Van Frankenhuyzen, K., Nystrom, C.W., and Tabashnik, B.E. 1995. Variation in tolerance to *Bacillus thuringiensis* among and within populations of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in Ontario. J. Econ. Entomol. 88: 97-105.

Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B.D., and Van Mellaert, H. 1990. Mechanisms of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 247: 72-74.

Vandenberg, J.D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 83(3): 755-759.

Vandenberg, J.D., and Shimanuki, H. 1986. Two commercial preparations of the ß-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* influence the mortality of caged adult honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Environ. Entomol. 15: 166-169.

Visser, S., Addison, J.A., and Holmes, S.B. 1994. Effects of DiPel® 176, a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*B.t.k.*) formulation, on the soil microflora and the fate of *B.t.k.* in an acid forest soil: a laboratory study. Can. J. For. Res. 24: 462-471.

Wagner, D.L., Peacock, J.W., Carter, J.L., and Talley, S.E. 1996. Field assessment of *Bacillus thuringiensis* on nontarget Lepidoptera. Environ. Entomol. 25(6): 1444-1454.

Warren, R.E., Rubenstein, D., Ellar, D.J., Kramer, J.M., and Gilbert, R.J. 1984. *Bacillus thuringiensis* in soil by immunofluorescence. J. Invertebr. Pathol. 43: 150-155.

Weber, W.C. 1993. Potential effect of gypsy moth spraying on songbirds in south coastal British Columbia. BC Ministry of Agriculture, Fisheries & food. In Information Submitted to BC Environmental Appeal Beard, March 1993 by Agriculture Canada. pp. 238-246.

Whalon, M.E., and McGaughey, W.H. 1993. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. In: Advanced engineered pesticides (Edited by L. Kim). Marcel Dekker, New York. pp. 215-232.